

Universitätsspital Zürich
Departement für Frauenheilkunde
Vorsitzender: Prof. Dr. med. R. Zimmermann
Klinik für Gynäkologie
Direktor: Prof. Dr. med. D. Fink

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. phil. II André Fedier und Dr. med. Patrick Imesch

**Liposomal verpacktes Cytochrom c aktiviert den intrinsischen
Apoptoseweg in Zervixkarzinomzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
Patrizia Antonia Niedermann
von Niederbüren SG

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. med. D. Fink
Zürich 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	
2.1. Problemstellung und Projektidee	2
2.2. Apoptose	3
2.2.1. Intrinsischer Apoptoseweg	5
2.1.2. Extrinsischer Apoptoseweg	8
2.3. Zufuhr von exogenem Cytochrom c und Aktivierung der Apoptose	9
2.3.1. Mikroinjektion und Elektroporation	9
2.3.2. Liposomen	10
2.4. Zielsetzung der Arbeit	14
3. Material und Methoden	
3.1. Herstellung der Liposomen	15
3.2. Zellen und Zellkultivierung	15
3.3. Koloniebildungstest (Colony Forming Assay)	17
3.4. Herstellung der Zelllysate	19
3.5. Gelelektrophorese und Western Blotting (Nachweis der Apoptose)	19
3.6. Trypanblau-Test	21
3.7 Auswertung und Statistik	22
4. Resultate	
4.1. Sensitivität von Hela-Zellen gegenüber freiem Cytochrom c	23
4.2. Sensitivität gegenüber SPC/Chol-liposomal-verpacktem Cytochrom c	24
4.2.1. Effekt auf die Klonogenizität	24
4.2.2. Effekt auf die Apoptose	25
4.2.3. Effekt auf die Nekrose	26
4.3. Sensitivität von HeLa-Zellen gegenüber DOPE/CHEMS-liposomal-verpacktem Cytochrom c (pH-sensitive Liposomen)	27
4.3.1. Effekt auf die Klonogenizität	27
4.3.2. Effekt auf die Apoptose	28
4.3.3. Effekt auf die Nekrose	30
5. Diskussion	
5.1. Aktivierung der intrinsischen Apoptose durch liposomal zugeführtes Cytochrom	31
5.2. Bedeutung der Arbeit	34
5.3. Ausblick	36
6. Literaturverzeichnis	38
7. Verdankungen	43
8. Curriculum Vitae	44

1. Zusammenfassung

Systemisch verabreichte Zytostatika sind für die Behandlung gynäkologischer Malignome bis heute eine unverzichtbare Therapieoption. Die Grenzen solcher Therapien, vor allem die sich als Folge der stark toxischen, körperfremden Substanzen ergebenden Nebenwirkungen, sind evident. Cytochrom c ist ein 12.3 kD Protein, welches im intermembranösen Raum der Mitochondrien lokalisiert ist und zum Elektronentransport in der Atmungskette und zur Energieerzeugung beiträgt. Andererseits wird Cytochrom c nach zellschädigenden Stimuli ins Zytoplasma freigesetzt, wo es zusammen mit Apaf-1 und der Initiatorcaspase-9 das Apoptosom bildet, gefolgt von der Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges durch die Effektorcaspasen-3 und -7. In dieser Studie wurde untersucht, ob auch von extern und mittels Liposomen in die Zellen gebrachtes Cytochrom c die Apoptose aktivieren kann. Eine Reihe von Cytochrom c-enthaltenden und leeren (ohne Cytochrom c) Liposomen unterschiedlicher Zusammensetzung, darunter solche aus pH-sensitiven Lipiden, wurden hergestellt und auf ihre hemmende Wirkung auf die Proliferation und ihren Apoptose aktivierenden Effekt in HeLa Zervixkarzinomzellen untersucht. Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit den pH-sensitiven Cytochrom c-Liposomen zu einer 3-fachen Reduktion der Proliferation im Vergleich zu den entsprechenden leeren Liposomen führte. Zudem konnte mit diesen pH-sensitiven Cytochrom c-Liposomen – nicht aber mit den leeren Liposomen – die für die Apoptose typische proteolytische Spaltung der Caspasen-3, -7 und -9, sowie von PARP-1 gezeigt werden. Freies (nicht liposomal-verpacktes) Cytochrom c aber beeinträchtigte die Proliferation und Apoptose nicht. „Konventionelle“ Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen hatten keinen Cytochrom c-spezifischen Effekt auf die Proliferation und Apoptose. Cytochrom c kann mittels Liposomen von extern in Tumorzellen gebracht werden und kann nachfolgend eine Caspasen-abhängige Apoptose auf dem intrinsischen Weg einleiten. Dies macht Cytochrom c-enthaltende Liposomen zu einem neuen und viel versprechenden Konzept für die Entwicklung neuer antineoplastischer Therapien. Zudem dürften durch die Verwendung eines per se nicht toxischen, körpereigenen Proteins die Nebenwirkungen der bisherigen Zytostatika gemindert werden.

2. Einleitung

2.1. Problemstellung und Projektidee

Systemisch verabreichte Chemotherapeutika sind in der Behandlung gynäkologischer und anderer Malignome bis heute eine unverzichtbare Therapieoption. Die Grenzen und Limitationen sind aber evident. So spielen einerseits nebst Resistenzentwicklung vor allem die negativen Nebenwirkungen, welche sich als Folge der stark toxischen, körperfremden Substanzen hinreichend erklären lassen, eine entscheidende Rolle und sind oftmals verantwortlich für einen vorzeitigen Therapieabbruch. Die Suche nach und die Entwicklung von besser verträglichen, spezifischen und gleichzeitig wirksameren, d.h. anwendbar in kleinst-möglichen Dosierungen, Chemotherapeutika hat in den letzten Jahren zu deutlichen Verbesserungen in diesem Sinne geführt. Das Potenzial ist aber längst noch nicht ausgeschöpft.

Andererseits besteht das Problem, dass diese systemischen Therapien oftmals nur bedingt zielgerichtet sind, d.h. dass nicht nur das Tumorgewebe sondern auch umliegendes gesundes Gewebe angegangen wird. Darüber hinaus ist die Pharmakokinetik nur bedingt steuerbar, und die therapeutisch aktiven Substanzen können durch körpereigene Systeme (Makrophagen und andere Detoxifizierungsprozesse) inaktiviert oder sogar zerstört werden bevor diese beim Tumorgewebe angelangt sind. Nebst Anwendungen, bei welchen die Therapeutika direkt in die Tumormasse appliziert werden, z.B. Mikroinjektion oder Elektroporation, hat vor allem die Nanotechnologie in den letzten Jahren einige wichtige Fortschritte insbesondere im Hinblick auf das „Drug Delivery“ gebracht. Zu nennen sind hier neben den nanotechnologiebasierten Polymeren aus organischen (z.B. PLGA-Microspheres) oder anorganischen (z.B. Dendrimere, Karbon-Nanotubes) Verbindungen vor allem die Liposomen. Liposomen sind „Hohlkugeln“ bestehend in der Regel aus einer äusseren Lipid-Doppelschicht, welche im Innern einen hydrophilen (wasserliebenden) Hohlraum bildet, in welchem hydrophile Substanzen wie z.B. einige Chemotherapeutika, „eingepackt“ oder „eingekapselt“ werden können. Die Liposomen gelten insbesondere aus klinischer Sicht als vielversprechende „Drug Delivery“ Systeme, da in einigen klinischen Studien die liposomalen Formulierungen von Chemotherapeutika ein

deutlich besseres Nebenwirkungsprofil bei mindestens gleicher Wirksamkeit zu verzeichnen war als mit den „nackten“ Chemotherapeutika.

Die Idee der vorliegenden Arbeit war zweiteilig und soll die beiden oben genannten Aspekte vereinigen. (i) Ein „zell-eigenes“ Protein mit pro-apoptotischer Eigenschaft (statt einer zell-fremden“, toxischen Substanz) soll mittels Liposomen von ausserhalb ins Zytoplasma von Tumorzellen gebracht werden. Das Protein der Wahl ist Cytochrom c als ein zentrales Element des Apoptoseprozesses. (ii) Dieses liposomale Cytochrom c soll die intrinsische Apoptose aktivieren, und zwar ohne die Notwendigkeit eines zusätzlichen pro-apoptotischen Stimulus oder Faktors. Im Vordergrund standen einerseits die Herstellung dieser Cytochrom c-Liposomen und andererseits die funktionelle Validierung in vitro in einem Zellkultursystem. Im Folgenden sind die für diese Arbeit relevanten Strukturen und Prozesse kurz beschrieben.

2.2. Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des Zelltodes, der durch die Aktivierung eines genetisch fixierten Selbstmordprogrammes der Zelle erfolgt und wird deshalb „programmierter Zelltod“ genannt (1, 2). Das physiologische Selbstmordkonzept wurde 1990 intensiv auf molekularer Basis von Horvitz et al beschrieben. Sie zeigten, dass es im Nematoden (Fadenwurm) *Caenorhabditis elegans* einen intrinsischen Signalweg gibt, der den Zelltod einer Gruppe spezifischer Neuronen während der Entwicklung kontrolliert. Durch quantitative Analysen entdeckten Ellis und Horvitz 1986, dass während der Embryogenese genau 131 von 1090 somatischen Zellen eben durch Apoptose zugrunde gingen (3). Die Apoptose ist evolutionär gesehen ein hoch konserviertes, intrinsisches Programm, das in verschiedenen physiologischen (Wachstumskontrolle, Regulation der Gewebshomeostase) und pathologischen Situationen auftritt (4). Homologe Moleküle zu denen in *Caenorhabditis elegans* sind in allen höheren Organismen vorhanden. Die Dysregulation dieses Prozesses wird mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, die von tumorösen Veränderungen, autoimmunen Funktionsstörungen bis hin zu neurodegenerativen Erkrankungen und ischämischen Schäden reichen (5). Die Proteolyse von mehreren Zytoske-

lettproteinen (z.B. Aktin, Fodrin) führt zum Verlust der gesamten Zellform, der Abbau von Lamin führt zur Kernschrumpfung (6). Die entstandenen Apoptosekörperchen werden von Phagozyten aufgenommen, was eine potentielle Entzündungsreaktion verhindert (7).

Die Apoptose unterscheidet sich morphologisch von anderen Formen des Zelltodes, der Nekrose und der Seneszenz (8). Nekrose ist ein pathologischer Prozess auf verschiedene externe Stimuli. Dabei verlieren Ionenpumpen ihre Funktion; dies bewirkt, dass extrazelluläre Ionen und Wasser in die Zellen einfließen, sie dadurch anschwellen lassen (Onkose) und sie in der Folge zum Platzen bringen. Die metabolische Aktivität wird zudem rasch eingestellt, was schlussendlich zum Zelltod führt. Anders als bei der Apoptose lockt der freigesetzte Zellinhalt Zellen des Immunsystems an, was zu einer lokalen Entzündungsreaktion führt. Apoptose und Onkose sind genau genommen prämortale Prozesse, die Nekrose beschreibt einen postmortalen Zustand (6,9). Diese Zusammenhänge veranschaulicht **Abb. 1**. Bei der Apoptose wird überdies zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Apoptoseweg unterschieden (3,10,11).

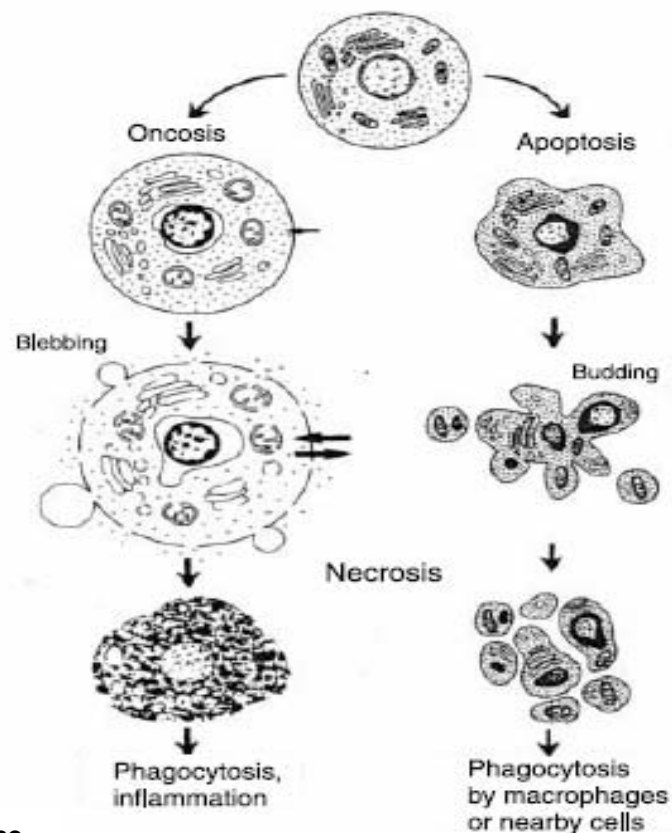


Abb. 1: Apoptose, Onkose, Nekrose

Entnommen aus Ref. 9.

2.2.1. Intrinsischer (Cytochrom c/Mitochondrien-vermittelter) Apoptoseweg

Wie bereits erwähnt, gibt es zwei verschiedene Wege, um die Apoptose zu induzieren: den intrinsischen und der extrinsischen Weg (10,11,12). Der intrinsische Weg läuft über die Mitochondrien. Hauptereignisse sind dabei (i) der Efflux von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma nach entsprechenden pro-apoptotischen Stimuli und (ii) die nachfolgende Bildung des Apoptosoms. Der intrinsische Apoptoseweg wird auch Cytochrom c-vermittelter Weg genannt. Er ist ein Kernstück der vorliegenden Arbeit und wird hier genauer beschrieben (**Abb. 2**).

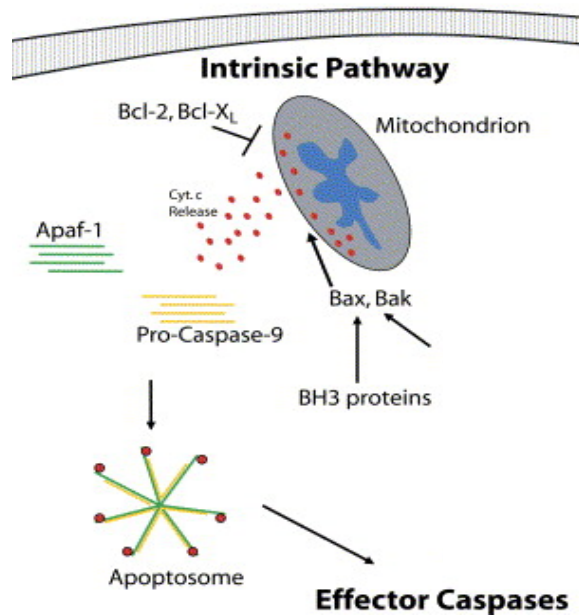


Abb. 2: Intrinsische Apoptoseweg

Modifiziert aus Ref. 12.

Nach einem pro-apoptotischen Stimulus (DNA-Schädigung oder andere Stresssituation) wird pro-apoptotisches Bid gespalten und aktiviert die pro-apoptotischen Bax und Bak durch die Losbindung von Bak und Bax aus Aggregaten mit anti-apoptotischen Faktoren der Bcl-2-Familie wie Bcl-2 und Bcl-xL. Diese nun monomeren Bax und Bak aggregieren nun zu homotypischen Oligomeren, welche ihrerseits grosse Kanäle oder Poren in der Aussenmembran des Mitochondriums produzieren. Dies ermöglicht die Freisetzung von löslichen Proteinen aus dem Zwischenraum (12,13). Eines dieser Moleküle ist Cytochrom c.

Cytochrom c ist ein 12.3 kD Protein (14,15), welches aus einer Polypeptidkette und einer einzigen Hämgruppe (**Abb. 3**), welche kovalent an Cys12 und Cys17 gebunden ist, besteht. Das Cytochrom c ist normalerweise im intermembranösen Raum der Mitochondrien lokalisiert und trägt dort zum Elektronentransport in der Atmungskette und somit zur Energieerzeugung bei (16). Charakteristisch ist bei dieser Art der Apoptose, dass die letale Eigenschaft des sonst lebensnotwendigen Cytochrom c einzig durch den „Kompartimentswechsel“ des Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma bewerkstelligt wird.

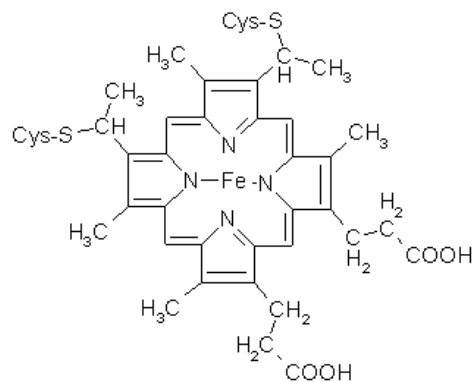


Abb. 3: Cytochrom c.

Im Zytosol angelangt bindet Cytochrom c an die C-terminale Region von Apaf-1 (12,17), der erste Schritt zur Ausbildung des so genannten Apoptosoms. Der „Apoptose Protease Activating Factor (Apaf-1)“ besteht aus insgesamt drei Domänen (**Abb. 4**): einer „N-terminal Caspase-Recruitment Domain (CARD)“, einer CED-4 Domäne und einer Reihe von „C-terminal WD Repeats (WDR)“. Durch die Bindung von Cytochrom c mit Apaf-1 (**a**) wird die Bindung von dATP mit Apaf-1 erleichtert, welche die CARD von Apaf-1 zugänglich macht. Nach dATP-Hydrolyse erfolgt die Heptamerisierung von Apaf-1, d.h. die Bildung eines 7-mers (**b**). Die dritte Komponente in der Apoptosombildung ist die Proinitiatorcaspase-9, welche mit seiner eigenen CARD-Domäne an die einzelnen (der insgesamt 7) Apaf-1-Moleküle bindet (**c**). Die inaktive Proinitiatorcaspase-9 wird nun aktiviert, indem sie, begünstigt durch ihre gegenseitige Nähe innerhalb des Apoptosoms, Dimere ausbilden. Diese Dimerisierung ist eine Voraussetzung für die autokatalytische Caspase-9 Aktivierung, d.h. proteolytische Spaltung der inaktiven Proinitiatorcaspase-9, in seine aktive Initiatorcaspase-9.

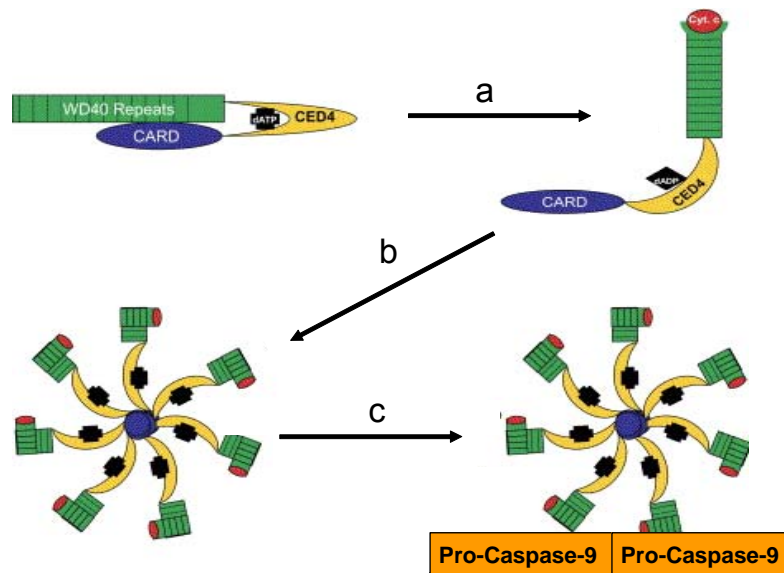


Abb. 4: Bildung des Apoptosoms

Bindung von Cytochrom c an Apaf-1 (a); dATP-Hydrolyse und Bildung des Apaf-1-Heptamers (b); Bindung von Proinitiatorcaspase-9 an die einzelnen Apaf-1 (c). Modifiziert aus Ref. 12.

Der gebildete Apoptosomkomplex dient in der weiteren Kaskade als Aktivator der Effektorcaspasen-3 und -7. Wie die Initiatorcaspasen sind auch die Effektorcaspasen als inaktive Vorläuferformen vorhanden. Sie werden erst durch die proteolytische Spaltung aktiviert; d.h. erhalten die Fähigkeit, andere Substratproteine (z.B. PARP-1, Aktin, Fodrin) zu spalten und zu zersetzen, was letztendlich zur „Auflösung“ der Zellen führt (18,19).

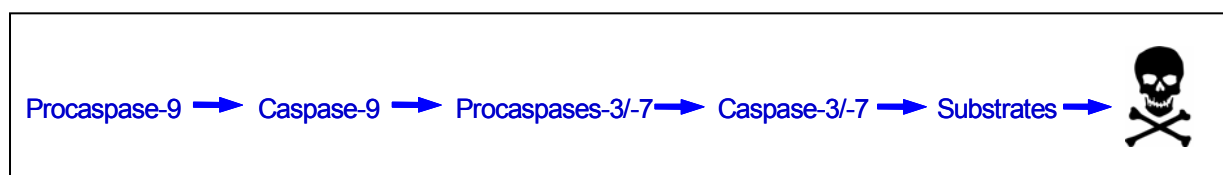


Abb. 5: Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 und Proteolyse ihrer Substrate

Modifiziert aus laborinterner Graphik.

Die Effektorcaspasen-3 und -7 und die nachfolgende Proteolyse ihrer Substrate sind auch Bestandteil des extrinsischen Weges.

2.2.2. Extrinsischer (Rezeptor-vermittelter) Apoptoseweg

Nebst dem intrinsischen („Cytochrom c-vermittelten“) Apoptoseweg, gibt es auch den extrinsischen (Rezeptor-vermittelten) Weg der Apoptose (**Abb. 6**). Dieser ist für die vorliegende Arbeit weniger relevant und wird deshalb nur kurz beschrieben.

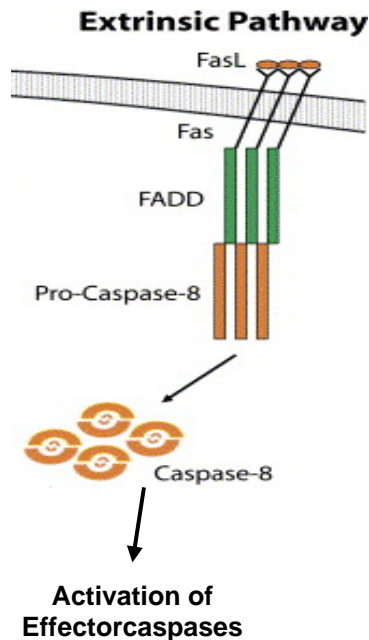


Abb. 6: Extrinsischer Weg zur Aktivierung der Effektorcaspasen

Modifiziert aus Ref. 12.

Die Apoptose des extrinsischen Weges wird induziert, indem ein Ligand an einen spezifischen Rezeptor in der Zellmembran bindet. Bekannte Liganden sind der Fas-Ligand (FasL) und der Tumornekrosefaktor α (TNF α) (20). Nach der Bindung des trimerischen Fas-Liganden rekrutiert das Fas (CD95 oder APO-1) ein zytosolisches Adapterprotein FADD (Fas-associated Death Domain) durch eine homotypische Interaktion zwischen der intrazellulären „death domain“ (DD) von Fas und der C-terminalen „death domain“ von FADD. Die Stimulation dieser sogenannten „Death Receptors“ (z.B. Fas oder „TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors (TRAIL)“, führt letztlich zur proteolytischen Spaltung der Pro-Initiatorcaspasen-8 und -2. Diese (katalytisch) aktiven Initiatorcaspasen-8 und -2 können nun die inaktiven Pro-Effektorcaspasen-3 und -7 spalten und ihrerseits aktivieren (21).

TNF α (nicht dargestellt) ist ein weiterer extrinsischer Ligand und bindet an TNFR1 (22). Die „TNFR1-associated Death Domain“ (TRADD) wird mit TNFR1 verbunden. Durch Bindung an FADD vermittelt TRADD die Apoptose, sodass Fas und TNFR1 schliesslich beide FADD benutzen, um das Todessignal umzusetzen (23,24).

Genetische Studien besagen, dass die Rezeptor-vermittelte Apoptose für die normale Funktion des Immunsystems entscheidend ist. Mutationen z.B. an Fas und an Fas-Liganden können zu komplizierten Autoimmunkrankheiten führen, beispielsweise ALPS (autoimmune lymphoproliferative Syndrom) (25,26), die eine entsprechende Ähnlichkeit zum murinen lymphoproliferativen Syndrom und zur generalisierten lymphoproliferativen Funktionsstörung (lpr) ausweisen (27-29).

Studien zeigten auch, dass die beiden geschilderten Apoptosewege nicht strikt getrennt ablaufen, sondern dass sie miteinander interagieren und unter Umständen die Wirkung verstärken können (4,12,30). Ein Schlüsselmolekül in dieser Hinsicht ist das pro-apoptotische Bid. Bid, ein Substrat der Caspase-8 wird im Fas-, TNF α - und TRAIL-Rezeptor-vermittelten Zelltod aktiviert. Sobald Bid gespalten oder aktiviert ist, wandert es als tBid zum Mitochondrium und induziert dort die Abgabe von Cytochrom c.

2.3. Zufuhr von exogenem Cytochrom c und Aktivierung der Apoptose

2.3.1. Mikroinjektion und Elektroporation

Als Folge der oben ausgeführten Zusammenhänge schien es naheliegend zu testen, ob die intrinsische Apoptose auch durch von aussen („exogenes“) eingebrachtes Cytochrom c aktiviert werden kann, und zwar ohne den Efflux des endogenen Cytochrom c aus den Mitochondrien bemühen zu müssen. In der Tat, diese Studien wurden gemacht. Eine der erfolgreich eingesetzten Techniken war die Mikroinjektion. Dabei wurde Cytochrom c mittels feinsten Kanülen ins Zytoplasma einer Vielfalt von Säugetierzellen injiziert und anschliessend die proteolytische Spaltung der Effektorcaspasen gemessen (31-33). Um zu zeigen, dass der Zelltod nicht Folge

der mechanischen Einwirkung war, wurde in einer Kontrollgruppe Myoglobin mikroinjiziert, was keine Caspasenaktivierung nach sich zog und auch sonst keinen Zelltod bewirkte. Um zu zeigen, dass der Zelltod auch tatsächlich den intrinsischen Apoptoseweg nahm, wurden in weiteren Versuchen die Effektorcaspasen gezielt inhibiert, was auch prompt zu fehlendem Zelltod führte. In weiteren Arbeiten wurde untersucht, wie lange es dauert, bis das exogen zugeführte Cytochrom c das Apoptosom zu bilden und die Caspasen zu aktivieren vermag. Die Resultate ergaben, dass die Caspasen innert sieben Minuten nach Anwesenheit des Cytochrom c im Zytosol proteolytisch aktiviert wurden. Die Veränderungen der elektrischen Eigenschaften der Zellmembran und der Zelloberflächenmorphologie folgen der Caspasenaktivierung (34).

Vergleichbare Resultate wurden durch die Zuführung von exogenem Cytochrom c mittels Elektroporation von Tumorzellen (35) oder mittels Karbon-Nanotubes (36) oder so genannter PLGA-Microspheres erzielt (37). Diese Studien können zwar als „Proof-of-Principle“ angesehen werden, die klinischen Anwendungen sind aber problematisch: zum einen weil Mikroinjektion nicht praktikabel ist und zum anderen weil sich die diversen Nanopartikel gegenwärtig als instabil und schlecht verträglich erweisen. Ein „biologischeres“ und daher besser geeignetes wie auch klinisch applizierbares „Cytochrom c Delivery“ System ist demnach gefragt.

2.3.2. Liposomen

Seit der bahnbrechenden Beobachtung von Alec Bangham vor ungefähr 40 Jahren, dass Phospholipide in wässrigen Systemen geschlossene, doppelschichtige Strukturen bilden können, haben Liposomen einen weiten Weg zurückgelegt, um vom gerade noch exotischen Objekt der biophysikalischen Forschung zum viel versprechenden pharmazeutischen Träger für eine Vielzahl von Wirkstoffen zu werden (**Abb. 7**). Der wirkliche Durchbruch der Entwicklungen in diesem Bereich während der letzten 15 Jahren hat zur Zulassung von mehreren liposomalen Medikamenten geführt (38-40).

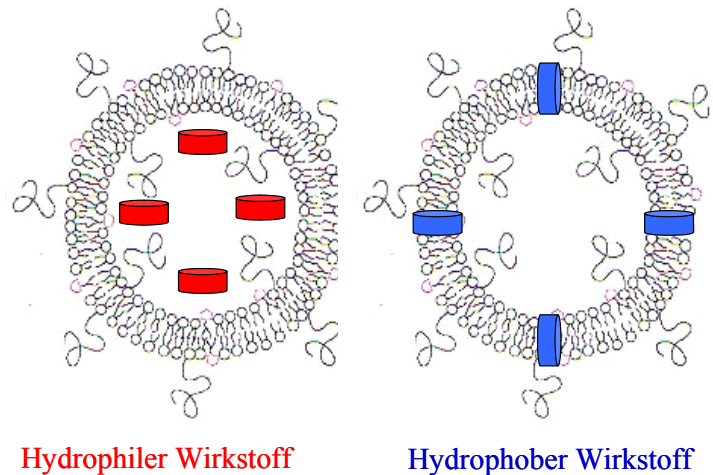


Abb. 7: Das Liposom und die Einschlüsse der Wirkstoffe

Schematische Darstellung eines Liposoms (aus Internet), bestehend aus einer Lipid-Doppelschicht („Hülle“) und einem wasserliebenden (hydrophilen, wässrigen) Innenraum. Durchmesser können von 50 bis 250 nm (oder noch mehr) reichen. Hydrophile Wirkstoffe lagern sich im wässrigen Innenraum (Lumen) des Liposoms ein. Lipophile (=hydrophobe) Wirkstoffe lagern sich in der Lipid-Doppelschicht des Liposoms ein (Darstellung rechts, adaptiert aus laboreigener Graphik).

Liposomen zählen zu den kleinsten künstlich herstellbaren Vesikeln; sie werden aus primär untoxischen Phospholipiden und Cholesterol hergestellt und können mit vielen unterschiedlichen Molekülen (chemischen Wirkstoffen, Proteinen, Nukleinsäuren) beladen werden (41).

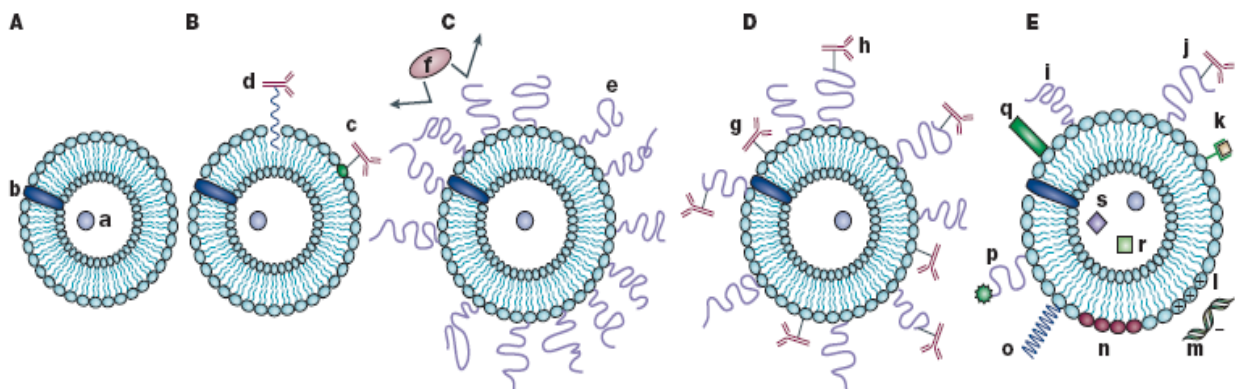


Abb. 8: Entwicklungsgeschichte der Liposomen

Entnommen aus Ref. 41.

Die einfachsten (konventionellen) Liposomen bestehen aus Phospholipiden und Cholesterol (**Abb. 8A**). Hydrophile Substanzen (**a**) lagern sich in der wässrigen Lösung im Innern des Liposoms ein, hydrophobe Substanzen (**b**) dagegen direkt in der phospholipid-haltigen Membran des Liposoms. Weil konventionelle Liposomen unspezifisch in jede Zelle gelangen würden, können sie mit Antikörpern (z.B. HER-2) bestückt werden (**c** und **d**), um zielgerichtet zu Tumorzellen zu gelangen und dort zu penetrieren (**Abb. 8B**).

Einfache Liposomen werden normalerweise als Folge der schnellen Opsonisierung der Liposomen rasch aus dem Blut entfernt und durch Zellen des Retikulo-Endothelialen-Systems (RES) vornehmlich in der Leber und der Milz eliminiert. Zahlreiche Entwicklungen, beispielsweise durch PEGylierung der Liposomen (**Abb. 8C**), konnten dieses Problem gezielt reduzieren (41). Das PEGylieren bedeutet das Überziehen der Liposomenoberfläche mit inerten, biokompatiblen Polymeren (42,43). Die einzelnen Modifizierungen können untereinander beliebig modifiziert werden (**Abb. 8D**). Weitere Modifikationen sind z.B. die Bestückung mit Nukleinsäuren oder mit Farbstoffen zur Tumordetektion (**Abb. 8E**).

Liposomen können auf verschiedenen Wegen in die Zellen gelangen (41).

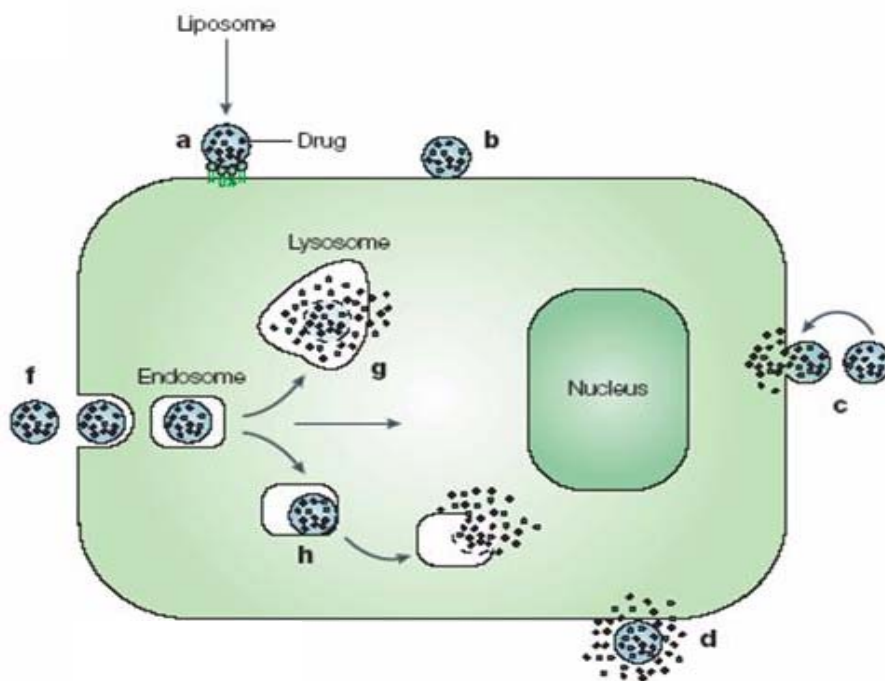


Abb. 9: Liposomen-Zellinteraktionen

Adaptiert aus Ref. 41.

Liposomen können an der Zielzelle spezifisch (**Abb. 9a**), falls mit Antikörpern bestückt, oder unspezifisch (**Abb. 9b**) andocken. Der Wirkstoff kann einerseits per Diffusion (**Abb. 9d**) in die Zelle gelangen, oder der Inhalt des Liposoms wird nach Membranfusionierung (**Abb. 9c**) internalisiert. Häufig werden Liposomen durch Endozytose aufgenommen (**Abb. 9f**). Oftmals gelangen sie aber nach dem Endosomreifungsprozess (frühes zum späten Endosom) ins Lysosom, wo Abbauprozesse durch lysosomale Enzyme stattfinden (**Abb. 9g**). Der Weg ins Lysosom ist aber negativ, weil damit die eingekapselte Wirksubstanz zerstört wird. Liposomen können aber mit pH-sensitiven Komponenten (z.B. Lipide) bestückt werden (**Abb. 9h**); nach der Endozytose fusioniert dieses pH-sensitive Liposom mit der Endovakuolenmembran. Unter der Wirkung des tieferen pH im späten Endosom werden die Lipide destabilisiert und ermöglichen dem Wirkstoff den Übertritt ins Zytoplasma, wo er seine Wirkung entfalten kann.

2.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Idee der vorliegenden Arbeit war, ein „zelleigenes“ Protein mit pro-apoptotischer Eigenschaft mittels eines geeigneten „Transporters“ von ausserhalb in Tumorzellen, d.h. genauer gesagt ins Zytoplasma, zu bringen, damit das auf diese Weise eingebrachte Cytochrom c spezifisch die intrinsische Apoptose aktivieren kann. Mit der Wahl von „zelleigenem“ Cytochrom c als ein zentrales Element des intrinsischen Apoptoseprozesses wird der Einsatz einer „zellfremden“, toxischen Substanz als „therapeutische“ Komponente vermieden. Zudem wird mit der Wahl von Liposomen ein biokompatibler und damit geeigneter „Transporter“ für das Cytochrom c verwendet. Wenn dies gezeigt werden kann, wäre es ein Schritt in Richtung der Entwicklung einer im Gegensatz zur Mikroinjektion oder eines operativen Eingriffs nicht-invasiven Applikation und einer im Gegensatz zu gängigen Chemotherapieformen relativ nebenwirkungsarmen Option zur Krebsbehandlung.

Im Vordergrund standen einerseits die Herstellung dieser Cytochrom c-Liposomen und andererseits die funktionelle Validierung *in vitro* in einem einfachen Zellkultursystem. Aufgrund dieser Ausgangslage ergaben sich die Arbeitshypothese und damit die folgenden konkreten Zielsetzungen.

Es soll also gezeigt werden, dass

- 1) Cytochrom c in Liposomen eingekapselt werden kann,
- 2) Liposomen mit eingekapseltem Cytochrom c von Tumorzellen aufgenommen werden,
- 3) so in Zellen geliefertes Cytochrom c die intrinsische Apoptose aktiviert ohne die Notwendigkeit zusätzlicher Faktoren oder Stimuli.

3. Material und Methoden

3.1. Herstellung der Liposomen

Folgende Liposomen-Formulierungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Reto Schwendener (Institut für Molekulare Krebsforschung, Universität Zürich) hergestellt: die SPC/Chol-Liposomen und die DOPE/CHEMS-Liposomen. Die erste Formulierung besteht aus einer (1.0:0.2)-Mischung des Lipids Soja Phosphatidylcholin (SPC) (Sigma; Buchs) und Cholesterin (Sigma). Die zweite besteht aus einer (1.0:0.46)-Mischung aus dem Lipid 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) (Sigma) und Cholesteryl-Hemisukzinat (CHEMS) (Sigma). Für die Herstellung der jeweiligen Cytochrom c-haltigen Liposomen wurde aus Pferdeherzen gewonnenes Cytochrom c verwendet (Sigma).

Die Herstellung der Liposomen erfolgte nach etablierten Standard-Protokollen. Kurz: in Rundkolben wurden Cholesterin und die entsprechenden Lipide in Methanol:Chloroform gelöst. Nach der Verdampfung des Methanol:Chloroform mittels eines Vakuum-Rotavap bildete sich ein Lipidfilm an der Innenseite des Rundkolbens. Nach der Zugabe eines Mannitol/Phosphat-Buffers im Falle der „leeren“ (nicht cytochrom c-enthaltenden) Liposomen oder desselben Buffers mit Cytochrom c (3mg/ml) im Falle der Cytochrom c-haltigen Liposomen löste sich der Lipidfilm auf, und es bildete sich eine milchige („leere“ Liposomen) oder eine rötliche, homogene (Cytochrom c-haltigen Liposomen) Suspension. Das Gefrieren dieser Suspension in flüssigem Stickstoff und dem anschliessenden Wiederauftauen bewirkt die Verpackung (Einkapselung) von Cytochrom c ins Innere der (zunächst) multilamellaren Liposomen. Durch das Extrusionsverfahren mittels eines Homogenisators bilden sich aus diesen schliesslich die „klassischen“ unilamellaren (Bilayer-)Liposomen. Die Liposomen wurden mittels einer Sephadex-Ionenaustauschersäule gereinigt, anschliessend sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

3.2. Zellen und Zellkultivierung

In dieser Arbeit wurde die adhärente HeLa Zervixtumorzelllinie verwendet, welche im Labor routinemässig kultiviert wird. Die HeLa Tumorzellen wurden in 7ml IMDM (Iscove's Modified

Dulbecco's Medium; Invitrogen AG, Basel), ergänzt mit 10% FCS (Fetales Kalbserum; Oxoid, Basel), bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ und 37°C im Inkubator (Brouwer, Luzern) in Zellkulturflaschen (25cm²) kultiviert. Die Zellen wurden alle 5 Tage routinemässig umgesetzt. Das Vorgehen ist in **Abb. 10** detailliert beschrieben. Mit einem Hämatozytometer (Neubauer-Kammer, Brand, Wertheim, Deutschland) wurde die Zelldichte (Anzahl Zellen pro Volumen Medium) bestimmt. Ein Teil der Zellen (z.B. 200'000) wurde in einer neuen Kulturflasche weiterkultiviert. Der andere Teil wurde für die Durchführung der Experimente gebraucht (siehe weiter unten).

Zellkulturflasche mit Medium und HeLa Zelllinie

1. Medium in der Kulturflasche mit Vakuumpumpe absaugen
2. 4ml HBSS (Hank's Balanced Saline Solution) dazugeben und gleich wieder absaugen
3. 1,5ml Trypsin-Lösung dazugeben und 3 min. einwirken lassen
4. 15-ml Falcon Tube mit 6ml Medium füllen
5. Trypsinisierte Zellen in Falcon Tube überführen
6. Zentrifugieren: 5 min. bei 200 x g (Eppendorf 5810R)

Falcon Tube mit 6ml Medium und Zellpellet

7. Medium absaugen (Zellpellet bleibt im Falcon Tube)
8. 1 ml Medium in Falcon Tube geben und Zellpellet lösen (Zellsuspension)

Neubauerzählkammer

9. 10 µl der Zellsuspension auf Neubauerzählkammer (Bild aus Internet) geben
10. Zellen in den vier grossen Eckquadranten zählen
11. Summe durch vier dividieren und Ergebnis mit 10'000 multiplizieren

$$\text{Beispiel: } ((534 + 602 + 721 + 499) : 4) \times 10'000 = 5'890'000$$

12. Ergebnis bedeutet: es sind 5,89 Millionen Zellen pro ml in der Zellsuspension im Falcon Tube

Neue Zellkulturflasche

13. Eine neue Zellkulturflasche mit 7 ml Medium füllen
14. Gewünschte Anzahl Zellen in µl vom Falcon Tube in die Zellkulturflasche transferieren (z.B. 34µl = 200'000 Zellen)
15. Zellkulturflasche in den Inkubator stellen

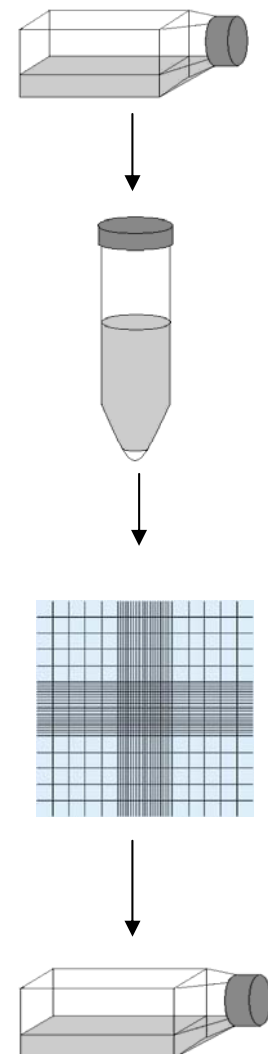


Abb. 10: Zellkultivierung: laborinternes Protokoll

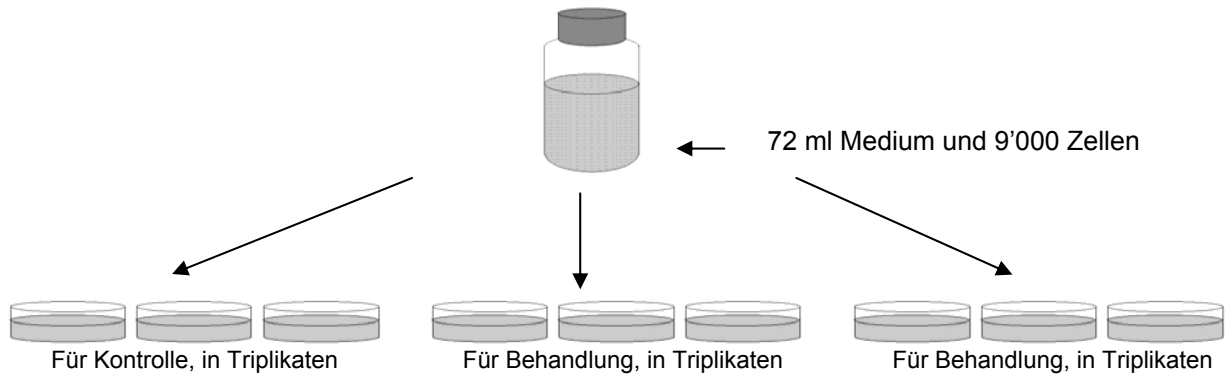
3.3. Koloniebildungstest (Colony Forming Assay)

Seit den sechziger Jahren wurden zum Testen der Empfindlichkeit (Sensitivität) und der Resistenz von Tumorzellen viele Methoden entwickelt. Der Koloniebildungstest (CFA: „Colony Forming Assay“ oder „Clonogenic Assay“) wurde erstmals 1977 beschrieben (44): Mit diesem Assay wurden Tumorzellen prätherapeutisch auf ihre Sensitivität gegenüber Zytostatika untersucht, indem ihr Wachstum und somit ihre Fähigkeit zur Vermehrung (Koloniebildung) bestimmt wurde.

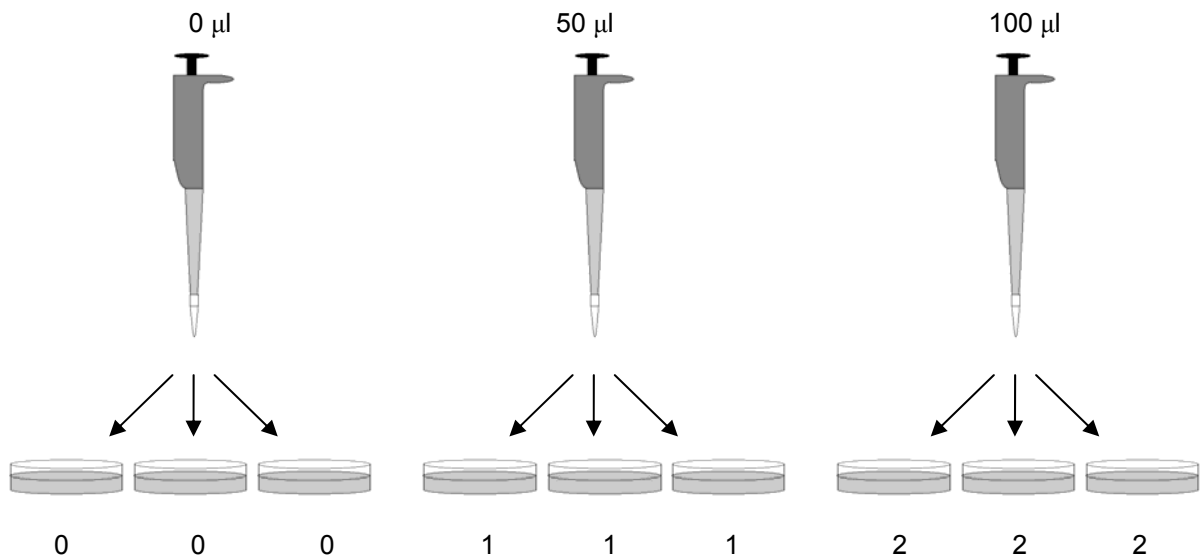
Dieser Assay wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Sensitivität der HeLa Tumorzellen gegenüber den liposomalen Formulierungen angewendet. Zu diesem Zweck wurde eine bestimmte Anzahl von Zellkulturschalen (60mm Durchmesser) vorbereitet, in welchen 500 Zellen in 4ml Medium pro Zellkulturschale ausgesät, dann mit Liposomen behandelt wurden und schliesslich zur Kolonienbildung 6-8 Tage lang weiter kultiviert wurden. Zur Sichtbarmachung der Kolonien wurden diese danach mit Essigsäure:Ethanol (1:3-Mischung) fixiert (20 Minuten) und mit Giemsa-Lösung (Merck; Darmstadt, Deutschland) gefärbt (20 Minuten). Nach der Färbung wurde die Giemsa-Lösung abgegossen und die Schalen in Wasser gewaschen und getrocknet. Die blau-gefärbten Kolonien (per Definition eine Ansammlung von mindestens 50 Zellen) wurden dann unter dem Mikroskop gezählt.

Ein repräsentativer Versuchsansatz ist in **Abb. 11** detailliert beschrieben.

1. Gewünschte Anzahl von Zellen in gewünschtes Volumen Medium in eine Glasflasche geben.
Beispiel: Pro Zellkulturplatte werden 500 Zellen/4ml Medium benötigt: bei 18 Zellkulturschalen sind das 9'000 Zellen (18 x 500 Zellen und 72 ml Medium (18 x 4 ml Medium)).
2. Je 4 ml davon in die Zellkulturplatte transferieren und alle Schalen in Inkubator stellen.



3. Nach 24 Stunden Mediumwechsel (serum-freies für serum-haltiges)
4. Liposomen in den gewünschten Mengen hinzufügen (nicht bei den unbehandelten Kontrollschalen. Schalen in den Inkubator stellen.



5. Nach weiteren 24 Stunden Mediumwechsel (serum-haltiges für serum-freies).
6. Nach weiteren 6-8 Tagen mit Giemsa färben und auszählen (Mikroskop). Auswertung.

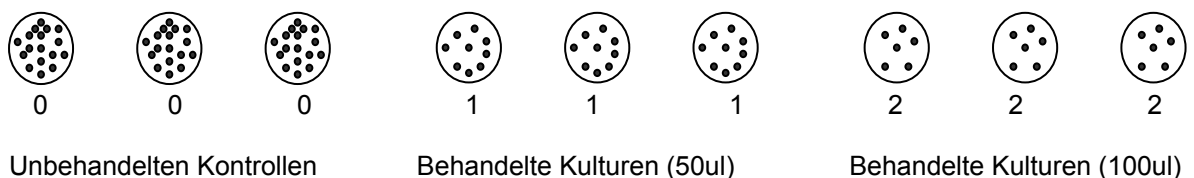


Abb. 11: Koloniebildungstest: Adaptiert nach laborinternem Protokoll

3.4. Herstellung der Zelllysate

Für die Herstellung der Zelllysate wurde nach Standardverfahren vorgegangen (45). Zuerst wurden 400'000 HeLa Tumorzellen in 2ml Medium pro Zellkulturschale (35mm Durchmesser) ausgesät und für 48 Stunden im Inkubator kultiviert. Nachdem das serum-haltige Medium durch 2ml serum-freies Medium ersetzt wurde, wurden die Kulturen mit den verschiedenen Liposomenformulierungen behandelt. Nach weiteren 18 Stunden wurde das Medium abgesaugt und in ein separates Röhrchen transferiert. Die Zellen wurden trypsinisiert (wie oben beschrieben) und anschliessend ebenfalls ins erwähnte Röhrchen gegeben. Dieses Vorgehen stellt sicher, dass auch sich im Medium befindende, von der Kulturschale abgelöste, apoptotische Zellen der Analyse unterworfen werden, d.h. kein Verlust an Zellen. Nach Zentrifugation (200xg, 5 Minuten, 4°C) wurde der Medium-Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in 1ml PBS (Phosphate Buffered Saline) in einem 2-ml Eppendorf Tube resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (200xg, 5 Minuten, 4°C) und dem anschliessenden Absaugen des PBS-Überstandes wurde das Zellpellet in 200ul Standard-Lyse-Buffer resuspendiert. Nach 20 Minuten auf Eis und anschliessender Zentrifugation (13'000xg, 20 Minuten, 4°C) wurde der die Proteine enthaltende Überstand (Lysat) abpipettiert (üblicherweise 200ul), in ein separates Tube transferiert und mit einem gleichen Anteil Standard-Probenlade-Buffer gemischt, 5 Minuten bei 95°C erhitzt, auf Eis gestellt und bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

3.5. Gelelektrophorese und Western Blotting (Nachweis der Apoptose)

Die Methode der Gelelektrophorese und des Western Blotting wird zur Auftrennung von Proteinen (gemäss ihres Molekulargewichtes) und zu deren Nachweis mittels spezifischer gegen ein bestimmtes Protein gerichteter Antikörper verwendet. Da in dieser Arbeit nach Standard-Protokollen verfahren wurde (45), wird das Vorgehen nicht detailliert beschrieben. Die wesentlichen Schritte sind hier aber erwähnt.

Gelelektrophorese: Dafür wurden Polyacrylamidgele verwendet, bestehend aus einem „oberen“ 5%-Sammelgel (Stacking Gel) und einem „unteren“ 10% oder 13% Trenngel (Resol-

ving Gel). Die vorbereiteten Proben (siehe 3.5) wurden aufgetaut, 1 Minute bei 60°C erhitzt und auf Eis gestellt. Anschliessend wurden jeweils 15ul der Proben und einer weiteren Probe mit Grössenmarkern in die Geltaschen geladen. Das „obere“ Sammelgel wurde 12 Minuten bei 85 Volt und das untere (gleich anschliessend) für ca. 90 Minuten bei 105 Volt laufen gelassen.

Blotting: Hiermit wurden die sich im Gel befindenden Proteine auf eine PVDF-Membran (Biorad; Reinach BL) geblottet (transferiert); dieser Transfer lief 75 Minuten bei 90 Volt. Danach wurde (zur Transferkontrolle) die PVDF-Membran 30 Sekunden in eine Färbelösung (Ponceau S, Sigma) gegeben, um die Proteine sichtbar zu machen. Diese Färbelösung wurde mit Wasser wieder gewaschen.

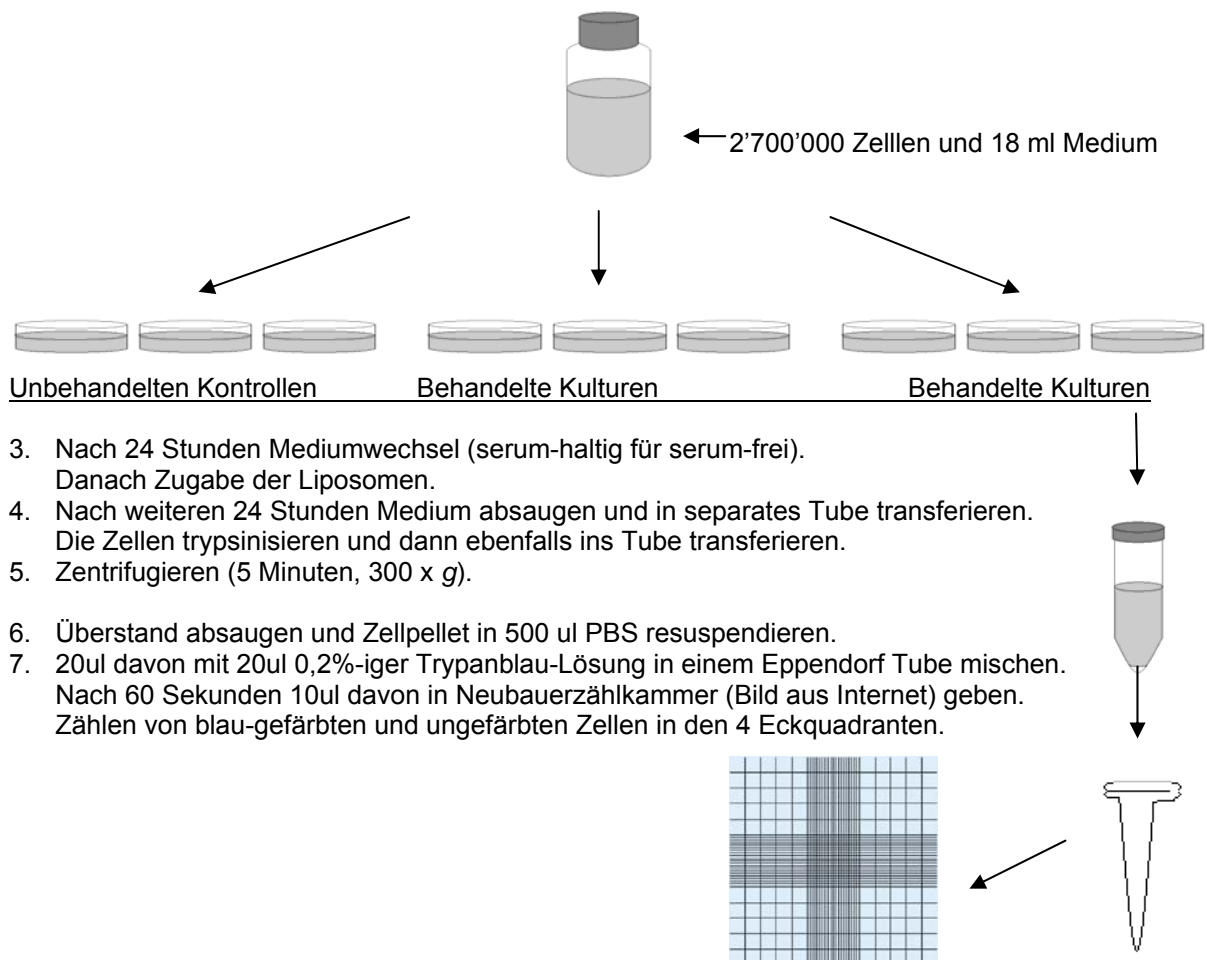
Blockieren: Die PVDF-Membran wurde dann für 90 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlraum bei 4°C in 3% fettarmem Milchpulver in TBST (Tris-Buffered Saline + 0.1% Tween-20) inkubiert.

Proteindetektion: Die Apoptose-relevanten Proteine (die Vorläuferformen und deren entsprechende Fragmente) wie PARP-1 (9542 und 9541, Cell Signalling, BioConcept; Allschwil) und die Caspase-3 (9662 und 9661, Cell Signalling), Caspase-7 (9492 und 9491, Cell Signalling) und Caspase-9 (9502 und 9501, Cell Signalling), sowie die sogenannten Probenladekontrollen Aktin (A-5441, Sigma) und Tubulin (2148, Cell Signalling) wurden detektiert mittels der entsprechenden primären Antikörper und mittels der entsprechenden HRPO (Horse-raddish Peroxidase)-konjugierten sekundären Antikörper (Anti-Mouse HRPO-IgG, M15345, Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA oder Anti-Rabbit HRPO-IgG, 7074, Cell Signalling) detektiert. Die Inkubationszeit der PVDF-Membranen mit den in ebenfalls 3%-Milch:TBST gelösten primären und sekundären Antikörpern betrug in der Regel 90 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Zur radiographischen Sichtbarmachung der Proteine-Antikörperkomplexe wurde das Chemilumineszenz-Verfahren (ECL; Amersham, Otelfingen) angewendet.

3.6. Trypanblau-Test

Der Trypanblautest wurde zum Nachweis von nekrotischen Zellen durchgeführt. Eine repräsentative Versuchsanordnung ist dargestellt (**Abb. 12**). Blaufarbte (nekrotische) und ungefarbte (lebendige) Zellen wurden gezählt.

1. Gewünschte Anzahl Zellen in gewünschtes Volumen Medium geben. Beispiel: Pro Kulturschale werden 300'000 Zellen/2ml Medium benötigt: bei 9 Kulturschalen = 2'700'000 Zellen / 18ml Medium
2. Je 2 ml davon in die Zellkulturplatte transferieren und alle Schalen in Inkubator stellen.



3. Nach 24 Stunden Mediumwechsel (serum-haltig für serum-frei). Danach Zugabe der Liposomen.
4. Nach weiteren 24 Stunden Medium absaugen und in separates Tube transferieren. Die Zellen trypsinisieren und dann ebenfalls ins Tube transferieren.
5. Zentrifugieren (5 Minuten, 300 x g).
6. Überstand absaugen und Zellpellet in 500 ul PBS resuspendieren.
7. 20ul davon mit 20ul 0,2%-iger Trypanblau-Lösung in einem Eppendorf Tube mischen. Nach 60 Sekunden 10ul davon in Neubauerzählkammer (Bild aus Internet) geben. Zählen von blau-gefärbten und ungefärbten Zellen in den 4 Eckquadranten.

Abb. 12: Protokoll des Trypanblau-Tests (nach laborinterner Anleitung)

3.7. Auswertung und Statistik

Beim Koloniebildungstest ist die relative Kolonienzahl (Prozent der unbehandelten Kontrolle) ermittelt aus den Mittelwerten der Triplikate gegen die Verdünnungen/Konzentration von „freiem“ Cytochrom c, der Cytochrom c-Liposomen, respektive der „leeren“ Liposomen aufgetragen. Beim Trypanblau-Test ist der relative Anteil von blau-gefärbten (nekrotischen) Zellen an der Gesamtheit der gezählten Zellen (blau-gefärbte und nicht-gefärbte) errechnet und in Prozent angegeben. Wenn nichts anderes vermerkt ist, wurden die Experimente dreimal in Triplikaten durchgeführt. Die Resultate sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

4. Resultate

4.1. Sensitivität von HeLa-Zellen gegenüber freiem Cytochrom c

Es wurde untersucht, ob nicht-intrazelluläres, d.h. freies, sich im Kulturmedium befindendes, Cytochrom c eine Wirkung auf die Klonogenizität (Überlebensrate) von HeLa Tumorzellen hat. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Cytochrom c behandelt: 25, 50 und 100 μM . Es zeigte sich (**Abb. 13**), dass die Klonogenizität bei allen Konzentrationen vergleichbar war mit derjenigen der unbehandelten Kontrolle. Damit reduziert Cytochrom c bis zu einer Konzentration von 100 μM (1,23 mg/ml Cytochrom c) die Klonogenizität der Zellen nicht.

Dies bedeutet, dass sich im Kulturmedium befindendes Cytochrom c keinen negativen Einfluss auf die Überlebensrate von HeLa Tumorzellen hat und nicht zytostatisch wirkt.

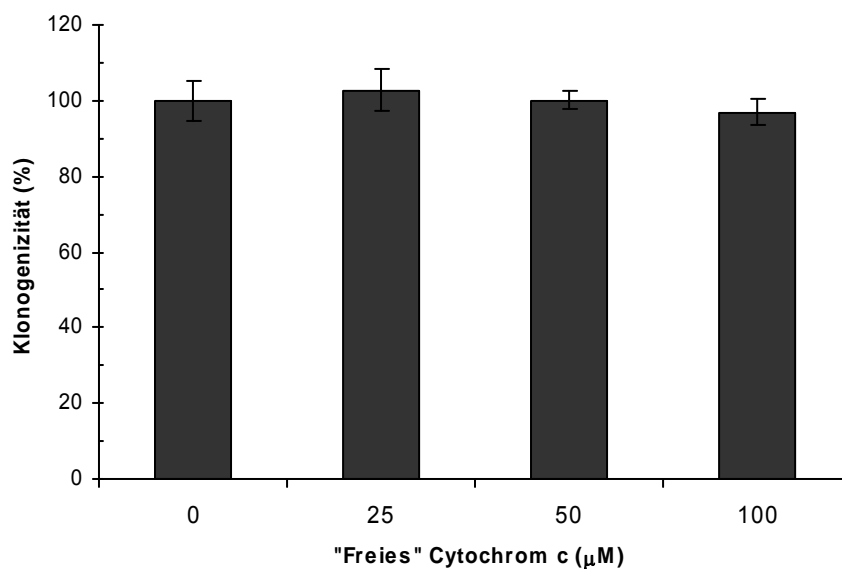


Abb. 13: „Freies“ Cytochrom c und Klonogenizität von HeLa-Zellen

Die Überlebensrate der HeLa-Tumorzellen (% Klonogenizität; y-Achse) aufgetragen als Funktion aufsteigender Konzentrationen von freiem Cytochrom c (x-Achse). Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.2. Sensitivität gegenüber SPC/Chol-liposomal-verpacktem Cytochrom c

4.2.1. Effekt auf die Klonogenizität

SPC/Chol-Liposomen zählen zu den einfachsten Liposomen. Gemäss unserer Arbeitshypothese wurde untersucht, ob (i) Cytochrom c verpackt in SPC/Chol-Liposomen die Klonogenizität von HeLa Zellen reduziert und ob (ii) dieser Effekt grösser ist als bei „leeren“ (nicht Cytochrom c-haltigen) Liposomen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (Verdünnungen) von Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen und den „leeren“ SPC/Chol-Liposomen behandelt. Es zeigte sich (**Abb. 14**), dass die Klonogenizität (in % der unbehandelten Kontrolle) durch die Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen deutlich weniger stark reduziert wird als durch die „leeren“ SPC/Chol-Liposomen. Die entsprechenden Werte waren 86% vs. 28% (3,1-fach, 1:200 Verdünnung), 58% vs. 25% (2,3-fach, 1:100) und 35% vs. 17% (2,2-fach, 1:50).

Somit sind die „leeren“ SPC/Chol-Liposomen offenbar zytostatischer als die Cytochrom c-haltigen SPC/Chol-Liposomen.

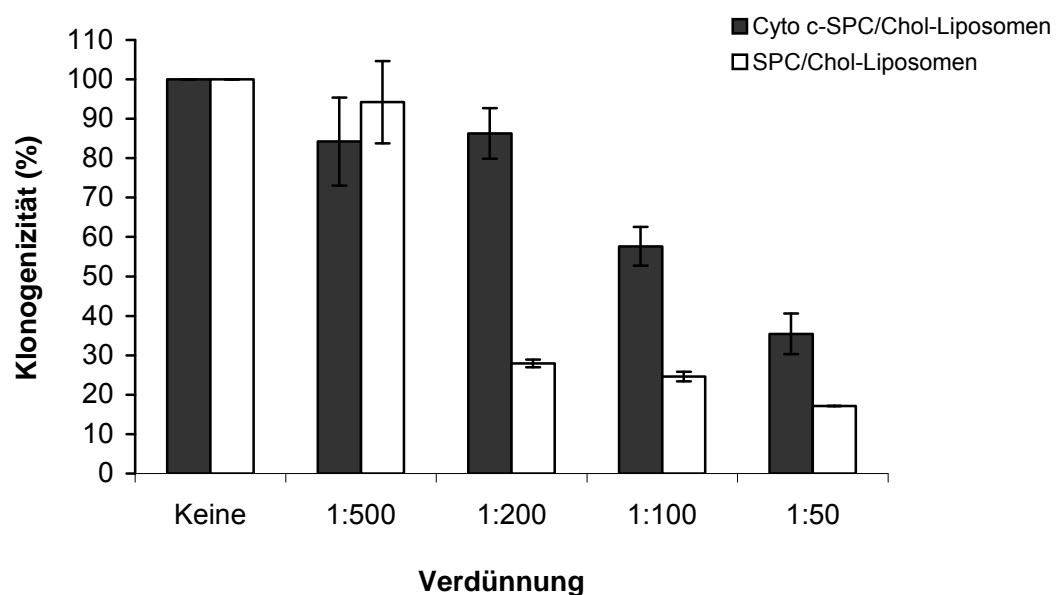


Abb. 14: SPC/Chol-verpacktes Cytochrom c und Klonogenizität

Die Überlebensrate der Zellen in Prozent (% Klonogenizität; y-Achse) aufgetragen als Funktion absteigender Verdünnungen mit Cytochrom c-SPC/Chol oder „leeren“ SPC/Chol-Liposomen (x-Achse). Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.2.2. Effekt auf die Apoptose

Es wurde untersucht, ob Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen die Apoptose induzieren, d.h. eine proteolytische Spaltung und damit eine quantitative Reduktion der Vorläuferformen von PARP-1 und Caspase-3 bewirken. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit verschiedenen Verdünnungen von Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen und den entsprechenden „leeren“ SPC/Chol-Liposomen behandelt und anschliessend für die Proteinanalyse präpariert. Basierend auf unserer Arbeitshypothese wäre zu erwarten, dass die Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen die Apoptose stärker induziert als die entsprechenden „leeren“ SPC/Chol-Liposomen. Andererseits könnte - aufgrund des Resultates des Klonogenizitätsversuchs - auch der umgekehrte Fall eintreten. Die Resultate zeigen (**Abb. 15**), dass sowohl bei den Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen wie auch bei den „leeren“ SPC/Chol-Liposomen keine Reduktion der Proteinbanden der Vorläuferformen von PARP-1 und Caspase-3 zu sehen war, wie dies bei der positiven Kontrolle mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) der Fall war.

Somit induzieren weder die „leeren“ noch die Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen eine Apoptose.

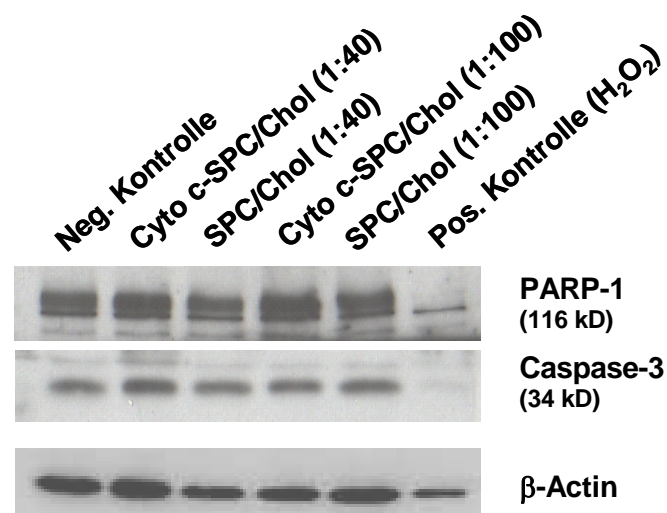


Abb. 15: SPC/Chol-verpacktes Cytochrom c und Apoptose

Keine proteolytische Spaltung der Vorläuferformen von PARP-1 und Caspase-3 durch die Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen sowie die „leeren“ SPC/Chol-Liposomen. Repräsentatives Beispiel von zwei unabhängigen Experimenten.

4.2.3. Effekt auf die Nekrose

Die bisherigen Resultate (4.2.1 und 4.2.2) zeigen, dass der zytostatische Effekt beider Formulierungen nicht mit Apoptose korreliert. Sie lassen deshalb vermuten, dass dieser Effekt eine andere Ursache haben könnte. Es wurde deshalb untersucht, ob SPC/Chol-Liposomen den nekrotischen Zelltod bewirken können. Die Resultate (**Abb. 16**) mit zwei vergleichbaren Verdünnungen von Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen und der „leeren“ SPC/Chol-Liposomen zeigen, dass in allen Fällen der Anteil der Trypanblau-positiven (d.h. der nekrotischen Zellen) nicht grösser war als bei der unbehandelten Kontrolle (ohne Liposomen).

Somit sind weder die „leeren“ noch die Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen nekrotisch. Der stärkere zytostatische Effekt bei den „leeren“ Liposomen ist nicht durch Nekrose bedingt.

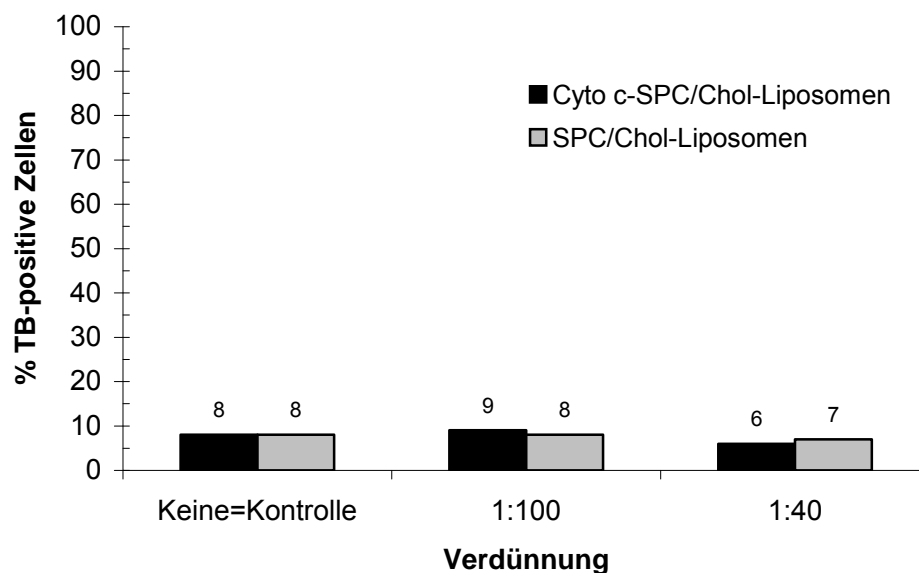


Abb. 16: SPC/Chol-verpacktes Cytochrom c und Nekrose

Kein Effekt der Liposomen auf die Nekrose, repräsentiert als der Anteil (% unbehandelte Kontrolle) von Trypanblau (TB)-positiver Zellen (y-Achse) als Funktion der Liposomen-Verdünnungen. Repräsentatives Beispiel von zwei unabhängigen Experimenten.

4.3. Sensitivität von HeLa-Zellen gegenüber DOPE/CHEMS-liposomal-verpacktem Cytochrom c (pH-sensitive Liposomen)

Die bisherigen Ergebnisse mit den SPC/Chol-Liposomen sind offenbar mit unserer Arbeitshypothese nicht vereinbar. Zudem wirken offenbar die SPC/Chol-Liposomen ab einer gewissen Konzentration per se zytostatisch. Gründe dafür könnten sein, dass die Cytochrom c-SPC/Chol-Liposomen einerseits von der Zelle gar nicht aufgenommen (endozytiert) werden. Andererseits könnten sie zwar endozytiert worden sein, werden dann aber entweder im Endosom zurückbehalten (keine Freigabe von Cytochrom c ins Zytoplasma) oder sogar zu den Lysosomen weitertransportiert (proteolytischer Abbau von Cytochrom c). In allen Fällen ist keine Apoptose zu erwarten.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Liposomen bestehend aus so genannten pH-sensitiven Lipiden die Endosomen wie auch die Liposomen destabilisiert werden, was zu einer Freigabe des endosomalen/liposomalen Inhaltes ins Zytoplasma führt und damit nicht zu einem Abbau dieses Inhalts in den Lysosomen. Diesen Ansatz der pH-sensitiven Lipide machten wir uns zu Nutze.

4.3.1. Effekt auf die Klonogenizität

Es wurden die pH-sensitiven Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen und die „leeren“ DOPE/CHEMS-Liposomen verwendet. Untersucht wurde, ob die Cytochrom c-enthaltenden Liposomen stärker zytostatisch wirken als die entsprechenden „leeren“ Liposomen. Die Resultate des Klonogenizitätsversuchs zeigen (**Abb. 17**), dass die Klonogenizität der HeLa Tumorzellen durch die Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen bei einer Verdünnung von 1:67 deutlich stärker reduziert wird als durch die „leeren“ DOPE/CHEMS-Liposomen (39% vs. 91%). Bei dieser Verdünnung war der Cytochrom c-bedingte Effekt etwa 2,3-fach und statistisch signifikant ($p < 0,05$). Hingegen war bei der kleineren 1:20 Verdünnung, d.h. einer höheren Konzentration, dieser Cytochrom c-bedingte Effekt nicht mehr zu beobachten (52% vs. 63%, $p = 0,401$).

Somit sind die HeLa-Zellen sensitiver gegenüber den Cytochrom c-enthaltenden DOPE/CHEMS-Liposomen als gegenüber den „leeren“ Liposomen. Ebenfalls wirken die „leeren“ DOPE/CHEMS-Liposomen ab gewissen Konzentrationen zytostatisch.

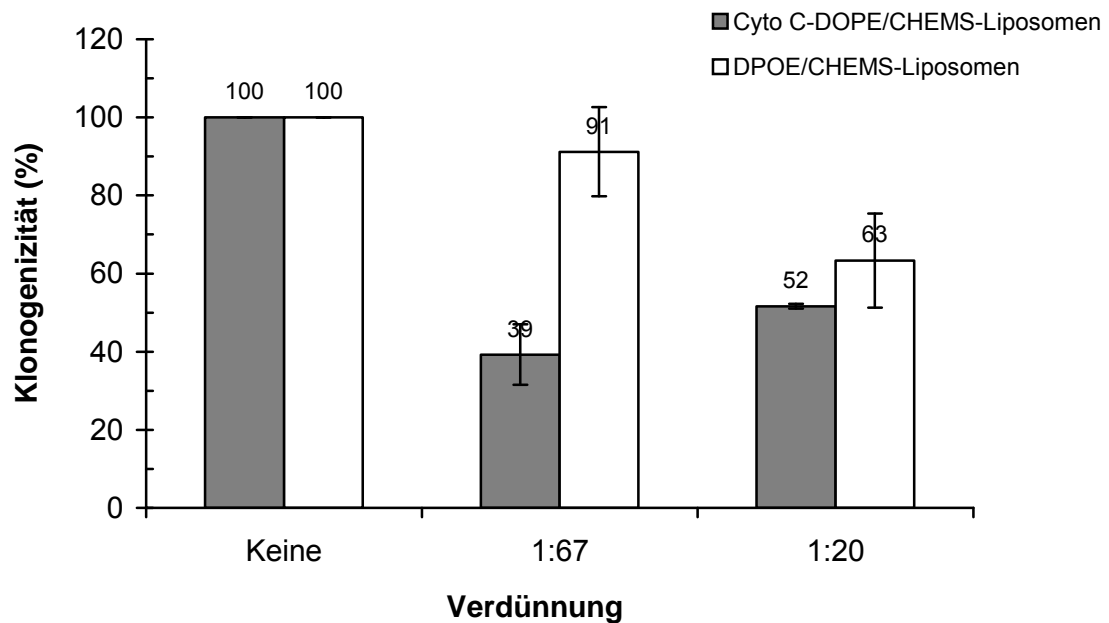


Abb. 17: DOPE/CHEMS-Liposomen-verpacktes Cytochrom c und Klonogenizität von HeLa-Zellen

Die Überlebensrate (% Klonogenizität; y-Achse) aufgetragen als Funktion absteigender Verdünnungen, respektive aufsteigender Konzentration, von Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen oder von „leeren“ DOPE/CHEMS-Liposomen (x-Achse). Mittelwerte \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

4.3.2. Effekt auf die Apoptose

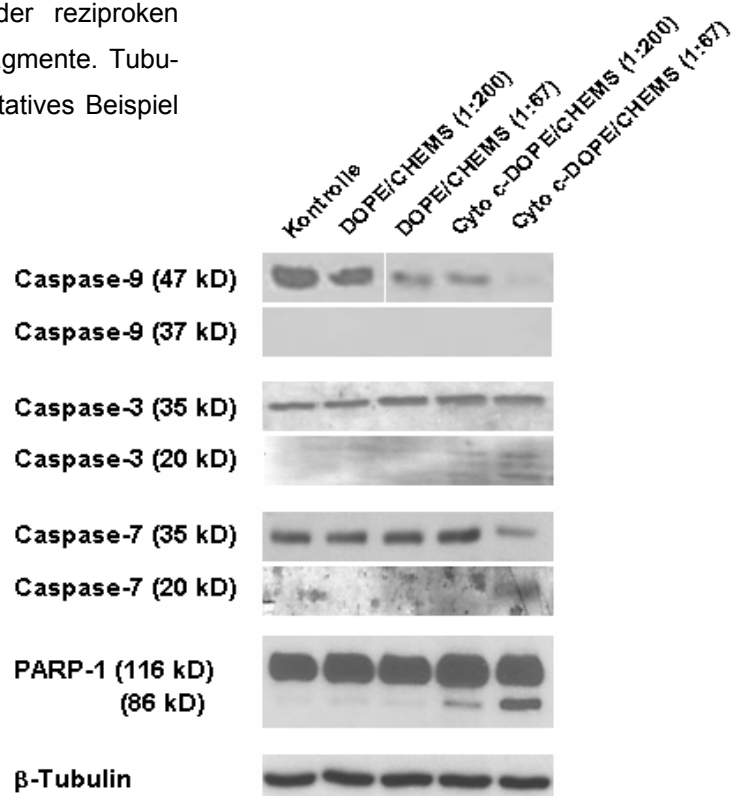
Es wurde untersucht, ob gemäß unserer Arbeitshypothese und mit Blick auf die entsprechenden Ergebnisse des Klonogenizitätsversuchs (siehe 4.3.1.) die Apoptose durch die Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen stärker induziert wird als durch die entsprechenden „leeren“ Liposomen. Die Resultate zeigen (**Abb. 18**): (i) Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen bewirkten die proteolytische Spaltung der 116kD Vorläuferform von PARP-1 und damit eine Akkumulation des entsprechenden 86kD Spaltproduktes; dies war weder bei den „leeren“ Liposomen noch bei der unbehandelten (Negativ-)Kontrolle zu beobachten. (ii) Die Reduktion der Menge an der 47kD Caspase-9 Vorläuferform war für die Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen je-

weils stärker als für die entsprechenden „leeren“ Liposomen und die unbehandelte Kontrolle. Das entsprechende 37kD Spaltprodukt war nicht nachzuweisen. (iii) Obwohl im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle und den „leeren“ DOPE/CHEMS-Liposomen keine Reduktion der 35kD Caspase-3 Vorläuferform nachzuweisen war, konnten spezifisch bei den Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen diverse Fragmente von Caspase-3 detektiert werden. (iv) Eine Reduktion der 35kD Vorläuferform der Caspase-7 und eine reziproke Akkumulierung des entsprechenden 20kD Fragmentes konnte bei der höchsten Konzentration (1:67 Verdünnung) spezifisch nur für die Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen nachgewiesen werden.

Somit induzieren die Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen - nicht aber die „leeren“ Liposomen - die Caspase-abhängige Apoptose. Die Reduktion der Initiatorcaspase-9 ist überdies ein Hinweis für die Aktivierung der intrinsischen Apoptose.

Abb. 18: Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen und Apoptose

Proteolytische Spaltung der Vorläufer von PARP-1 und den Caspasen-9, -7, -3, dargestellt als Reduktion der entsprechenden Proteinbanden und der reziproken Akkumulierung der entsprechenden Fragmente. Tubulin als Sample-Ladekontrolle. Repräsentatives Beispiel von zwei Experimenten.



4.3.3. Effekt auf die Nekrose

Die bisherigen Resultate mit den pH-sensitiven DOPE/CHEMS-Liposomen (4.3.1. und 4.3.2.) zeigen, dass der zytostatische Effekt der Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen mit Apoptose einhergeht. Es wurde auch untersucht, ob und allenfalls wie weit die Nekrose dabei eine Rolle spielt. Die Resultate (**Abb. 19**) zeigen, dass der Anteil an Trypanblau-positiven (nekrotischen) Zellen sowohl bei den Cytochrom c-DOPE/CHEMS-Liposomen wie auch bei den „leeren“ DOPE/CHEMS-Liposomen vergleichbar mit dem bei der unbehandelten Kontrolle war.

Dies bedeutet, dass die Liposomen keine Nekrose bewirken und dass damit die Nekrose keine Rolle spielt.

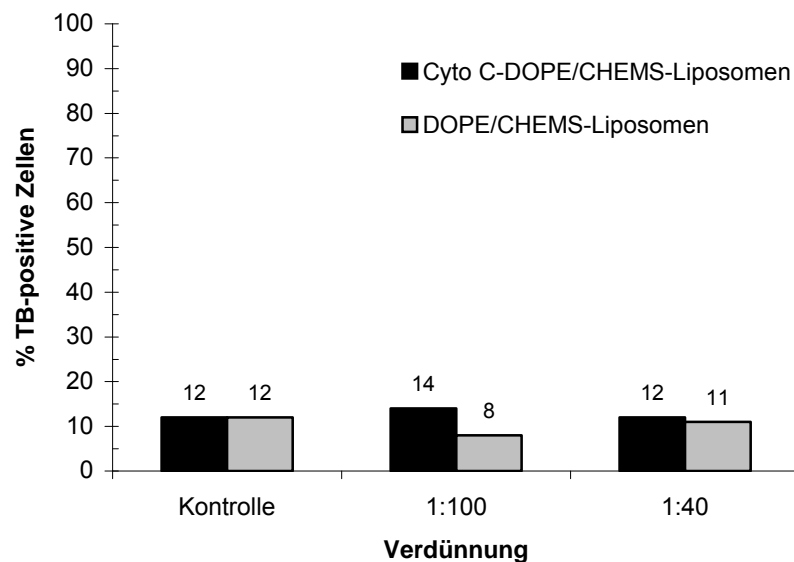


Abb. 19: DOPE/CHEMS-verpacktes Cytochrom c und Nekrose

Effekt der Liposomen auf die Nekrose, repräsentiert als der Anteil (% unbehandelte Kontrolle) von Trypanblau (TB)-positiver Zellen (y-Achse) als Funktion der Liposomen-Verdünnungen. Repräsentatives Beispiel von zwei unabhängigen Experimenten.

5. Diskussion

5.1. Aktivierung der intrinsischen Apoptose durch liposomal zugeführtes Cytochrom c

Die Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen: die Cytochrom c-enthaltenden pH-sensitiven DOPE/CHEMS-Liposomen bewirkten eine Cytochrom c-spezifische Reduktion der Proliferation und eine ebensolche Aktivierung des intrinsischen, Caspasen-abhängigen Apoptoseweges. Im Gegensatz dazu waren mit freiem (sich im Medium befindendem) Cytochrom c, mit Cytochrom c-enthaltenden „konventionellen“ SPC/Chol-Liposomen und mit „leeren“ Liposomen keine entsprechenden Wirkungen zu beobachten. Diese Ergebnisse waren nicht nur im Sinne unserer Arbeitshypothese. Sie lassen auch die Schlussfolgerung zu, dass erstens exogenes und in Liposomen eingekapseltes Cytochrom c ins Zytoplasma von Tumorzellen gebracht werden kann und dass zweitens so eingebrachtes Cytochrom c spezifisch die intrinsische Apoptose aktiviert und damit letztendlich die Tumorzellen zu zerstören vermag. Die Resultate werden nachfolgend diskutiert. Zur Veranschaulichung dient **Abb. 20**.

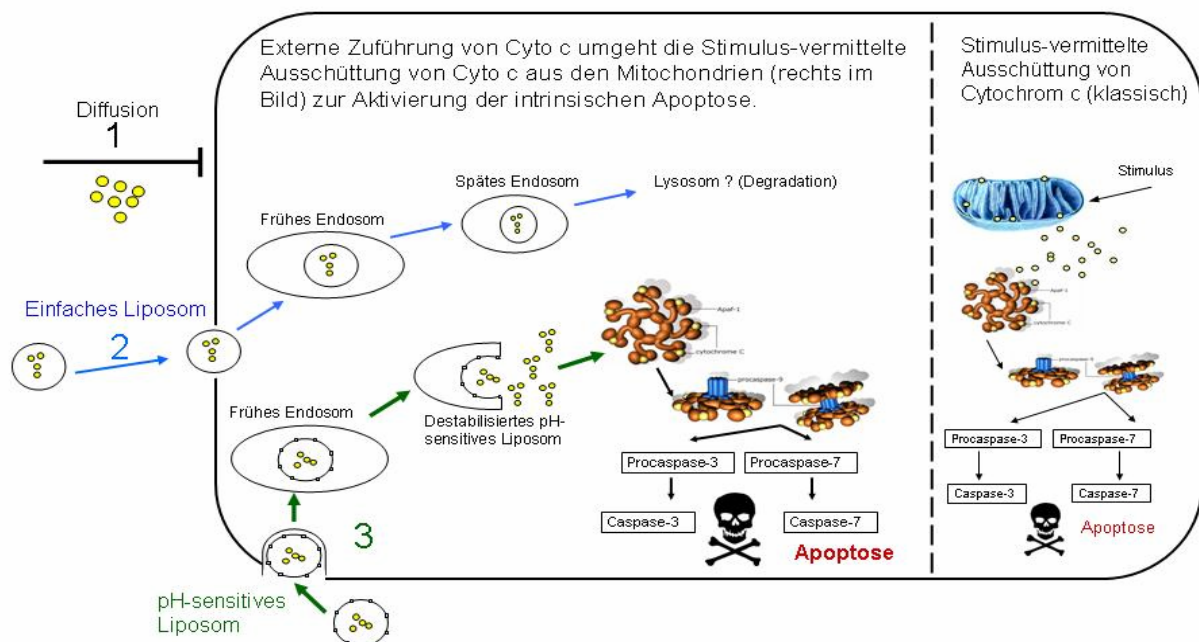


Abb. 20. Externe Zuführung von Cytochrom c zur Aktivierung der intrinsischen Apoptose (Modell)

1) Diffusion: Zellmembran ist impermeabel für Cytochrom c (Cytoc c; gelb). 2) Einfache Liposomen können nach Endozytose ins Lysosom gelangen und dort samt Cyto c zerstört werden (blaue Pfeile). 3) Das Cyto c-enthaltende pH-sensitive CHEMS/DOPE Liposom wird endozytiert. pH-Senkung im Endosom/Lysosom führt zur Liposomenruptur und Cytochrom c Freisetzung ins Zytoplasma (grüne Pfeile). Adaptiert aus laboreigener Graphik.

Dass freies, sich im Kulturmedium befindendes Cytochrom c keine entsprechende Wirkung hatte, mag nicht erstaunen (**Abb. 20-1**). Cytochrom c hat ein Molekulargewicht von 12.3 kDa und kann per se Zellmembranen nicht „durchqueren“. Ein spezifischer Transporter bringt nach seiner Synthese das Apocytochrom c (nicht-Häm Cytochrom c) vom Zytoplasma in die Mitochondrien, wo im übrigen auch die Häm-Gruppe eingesetzt wird. Umgekehrt braucht es für die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium nach schädigendem Stimulus deshalb eine Depolarisation der Mitochondrienmembranporen und -kanälen (14,15). Da die Möglichkeit, Cytochrom c als freie Form den HeLa Zellen zuzuführen, nicht erfolgreich war, erwägten wir eine andere Möglichkeit, wodurch das Cytochrom c direkt in die Zelle transportiert werden könnte.

Das wahrscheinlich am längsten bekannte, teils bereits im klinischen Alltag angewendete „Delivery System“, bilden die Liposomen. Sie können vereinfacht als Hohlkugeln aus Lipiden betrachtet werden. In deren Hohlraum können Wirksubstanzen wie beispielsweise chemotherapeutisch aktive Chemikalien, Nukleinsäuren und Proteine eingepackt (eingekapselt) werden, welche anschliessend zusammen mit den Liposomen in die Zellen hineingelangen, wo die Wirksubstanzen dann freigesetzt werden. Da Cytochrom c auch ein Protein ist, sollte es in einem theoretischen Modell auch möglich sein, Cytochrom c mittels Liposomen ins Zellinnere von HeLa Zellen zu bringen. Unsere ersten Versuche, welche mit einfachen (konventionellen) SPC/Chol-Liposomen (**Abb. 20-2**) durchgeführt wurden, zeigten aber, dass die mit Cytochrom c bepackten SPC/Chol-Liposomen keinen erhöhten Zelltod (proteolytische Spaltung der Caspasen-3, -7 und PARP-1) im Vergleich mit den entsprechenden „leeren“ Liposomen aufwiesen. Im Gegenteil, es schien sogar, dass im Koloniebildungstest die „leeren“ SPC/Chol-Liposomen effektiver wären, d.h. die Koloniebildung stärker verhinderten als die entsprechenden Cytochrom c-haltigen SPC/Chol-Liposomen.

In der Literatur wird das Problem beschrieben, dass einige Substanzen über den endozytischen Weg in die Zellen gelangen und über endosomale Reifungsprozesse im Lysosom enden, wo aktive Abbauprozesse unter der Wirkung der lysosomalen Enzyme stattfinden. Als

Resultat gelangt nur ein kleiner Teil der unberührten Substanz ins Zytoplasma, der einen ungenügenden Effekt auslöst. In unserem Falle könnte der Abbau von Cytochrom c im Lysosom im Anschluss an die Aufnahme der Liposomen mittels Endozytose und der Bildung eines „Endosom/Liposom“ eine mögliche Ursache und ein Erklärungsversuch für die fehlende Apoptoseinduktion mit SPC/Chol-Liposomen sein. Die Frage stellt sich, was nach dem Eintritt von Liposomen mit dem Cytochrom c in den Zellen geschieht. Gelangt das Cytochrom c auf direktem Wege, d.h. während des endosomalen Reifungsprozesses, ins Lysosom und wird dort verdaut? Oder kann das Cytochrom c aus dem Endosom und aus dem Lysosom in die Zellen abgegeben werden, bevor es im Lysosom endet? In der Literatur werden Methoden beschrieben, welche es den Wirkstoffen erlauben aus dem Endosom zu gelangen und im Zytoplasma die gewünschte Wirkung zu erzielen.

Liposomen aus pH-sensitiven Lipiden sind mögliche Kandidaten (**Abb. 20-3**). Grundlage dazu ist die folgende: nach der zellulären Aufnahme des Liposoms mittels Endozytose bildet sich ein „Endosom/Liposom-Aggregat“. Dieses macht einen Maturationsprozess durch, in dessen Folge der intraendosomale pH sauer wird. Die pH-sensitiven Liposomen enthalten Komponenten, welche im sauren Milieu eine Konformationsänderung durchmachen und dadurch instabil werden. Der Effekt ist, dass sich das „Endosom/Liposom-Aggregat“ auflöst und das Cytochrom c ins Zytoplasma entlässt. Dies geschieht, bevor das „Endosom/Liposom-Aggregat“ zum „Lysosom/Liposom-Aggregat“ reift. Um eine pH-sensitive Freisetzung des Cytochrom c zu erhalten, wurden Liposomen aus pH-sensitiven Komponenten hergestellt: CHEMS/DOPE-Liposomen. Dass dies der richtige Ansatz war, bestätigten unsere Resultate. Die mit Cytochrom c verkapselten Liposomen behandelten HeLa Zellen zeigten im Koloniebildungstest ein deutlich reduziertes Überleben und auch die Spaltung der Vorläufer der Caspasen-3, -7 und -9 sowie von PARP-1. Es wurde keine Nekrose mittels Trypanblautest nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigten auch, dass die Cytochrom c-CHEMS/DOPE-Liposomen die Apoptose über den intrinsischen Weg induzieren, ein essenzieller Aspekt unserer Arbeitshypothese.

Diese Arbeit zeigt, dass Cytochrom c via Liposomen von aussen ins Zytoplasma von Tumorzellen gebracht werden kann, wo es in der Tat die intrinsische, Caspase-abhängige Apoptose induziert. Diese Erkenntnis ergänzt andere Studien, in welchen pro-apoptotisch wirkende Substanzen wie Chemikalien, Nukleinsäuren und Proteine mittels Liposomen und anderer Nanopartikeln in Zellen gebracht werden konnten und die Apoptose induzieren konnten. Sogar für Cytochrom c gab es schon Arbeiten, in welchen Cytochrom c mittels Mikroinjektion oder mittels Elektroporation in Zellen gebracht wurde und dort die Apoptose aktivierte (31,32,35). Nebst diesen mechano-physikalischen wurden auch weniger invasive Ansätze gewählt, um Cytochrom c in Tumorzellen zu bringen: so zeigte Cytochrom c verpackt in PLGA-Microspheres (37) oder assoziiert mit Karbon-Nanotube (36) Apoptose aktivierendes Potenzial. Zwar zeigen all diese Arbeiten, dass es grundsätzlich möglich ist, mit körpereigenen Substanzen (wie Cytochrom c) alleine durch einen Kompartementswechsel, d.h. in diesem Falle von ausserhalb der Zelle ins Zytoplasma hinein mittels der genannten „Transportmittel“, die Apoptose zu induzieren. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch erstmals eine funktionelle Kombination von Cytochrom c als „therapeutisch aktive Substanz“ mit Liposomen als „Transportmittel“ oder „Drug Delivery Tools“ beschrieben.

Teile dieser Arbeit wurden anlässlich der 98-sten Jahresversammlung der American Association for Cancer Research (2007, Los Angeles, USA) vorgestellt (46).

5.2. Bedeutung der Arbeit

Die Bedeutung dieser Ergebnisse ist mehrfach. Sie liegt erstens in der erstmaligen funktionellen Beschreibung der Kombination von Cytochrom c und Liposomen als mögliche „therapeutische Einheit“. Diese Ergebnisse zeigen neben der Bestätigung, dass extrazellulär zugeführtes Cytochrom c die Apoptose aktivieren kann, vor allem, dass dies nicht durch die Verwendung einer „körperfremden“ und damit toxischen Drittsubstanz zustande kommt wie bei der konventionellen Chemotherapie, sondern allein durch die Verwendung einer körpereigener Substanz,

das Cytochrom c, und damit ohne die Notwendigkeit eines zusätzlichen pro-apoptotischen Stimulus oder Faktors. Durch den Einsatz von Cytochrom c könnte damit die toxische Wirkung der gängigen therapeutischen Substanzen deutlich vermieden werden und im klinischen Gebrauch eine bessere Verträglichkeit bei den Patienten erzielt werden.

Zweitens stellt die Wahl von Liposomen als „Drug Delivery Tools“ die unter klinischen Aspekten möglicherweise bedeutendste und geeignetste Form der zellulären Cytochrom c Zulieferung dar. Dies nicht zuletzt, weil Liposomen die zurzeit am besten erforschten „Drug Delivery Tools“ sind und weil viele der in letzter Zeit entwickelten Nanopartikel punkto Stabilität, Verträglichkeit und letztendlich Klinikauglichkeit noch immer unbefriedigend sind. Obwohl die systemische (konventionelle) Chemotherapie nach wie vor eine unerlässliche Therapieoption in der Behandlung von vielen Malignitäten ist, stellt diese Arbeit einen wichtigen Schritt dar in Richtung der Entwicklung einer im Gegensatz zur *in vivo* nur ganz beschränkt anwendbaren Mikroinjektion oder Elektroporation oder eines operativen Eingriffs nicht-invasiven Applikation und einer im Gegensatz zu gängigen Chemotherapieformen relativ nebenwirkungsarmen Option zur Krebsbehandlung.

Drittens könnte dieser Ansatz auch bei sonst Chemotherapie-resistenten Tumoren erfolgreich angewendet werden: durch die extrazelluläre Cytochrom c Zuführung kann somit der bei chemoresistenten Tumorzellen oftmals defekte, oberhalb der Cytochrom c Ausschüttung oder der Apoptosombildung liegende Apoptosesignalweg umgangen werden. D.h. der durch Überexpression von so genannten „Multidrug Resistance“ Transportern oder durch Mutationen im p53-Tumorsuppressor-Gen unterbrochene Apoptosesignalweg oder die durch Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 oder Bcl-xL unzureichende Cytochrom c-Ausschüttung kann durch von aussen zugeliefertes Cytochrom c „kompensiert“ werden. Möglicherweise könnte bei der Verwendung von Cytochrom c auch das Potenzial einer Resistenzbildung als Folge einer Chemotherapie reduziert werden.

5.3. Ausblick

Wie geht es weiter? Mit unseren Untersuchungen konnten wir sozusagen das „Proof-of-Principle“ zeigen. Es ist aber ebenso klar, dass weitere *in vitro* Untersuchungen folgen müssen, und dass der hier beschriebene Ansatz noch Optimierungspotenzial hat. Einige entsprechende Punkte sind hier kurz aufgeführt.

Es reicht zwar zu zeigen, dass die intrinsische Apoptose durch liposomal zugeführtes Cytochrom c aktiviert werden kann. Zum vollständigen Proof-of-Principle“ muss aber gemäß der Arbeitshypothese gezeigt werden, dass nur die intrinsische, nicht aber die extrinsische Apoptose, aktiviert wird. Experimentell kann dies durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren für die intrinsischen, respektive extrinsischen Caspasen getestet werden: So müsste die Hemmung der (intrinsischen) Initiatorcaspase-9 zu keiner Apoptose führen, wohingegen die Hemmung der (extrinsischen) Initiatorcaspase-8 nach wie vor zur Apoptose führt.

Des Weiteren wäre es durchaus informativ, mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie die Aufnahme der Cytochrom c-Liposomen in die Zellen optisch/bildlich darzustellen und so die Kinetik der Aufnahme wie die Lokalisation der Liposomen und von Cytochrom c in der Zelle zu dokumentieren. Mit Fluoreszenzmarkern (z.B. FITC, Rhodamin) ist es problemlos möglich, die Liposomen wie auch das Cytochrom c zu markieren und damit deren Schicksal in den Zellen im konfokalen Fluoreszenzmikroskop zu verfolgen. Diese Information kann auch zur Optimierung des Ansatzes verwendet werden.

Es gibt weitere Möglichkeiten, um eine effizientere Freisetzung von Cytochrom c aus Liposomen ins Zytoplasma zu erzielen. Einer der Nachteile bei der Anwendung von Liposomen generell ist die schnelle Eliminierung aus dem Blut und das Einfangen der liposomalen Präparate durch die Zellen des Retikuloendothelialen Systems vornehmlich in der Leber. Verschiedene Methoden sind vorgeschlagen worden, um *in vivo* eine lange Zirkulation zu erhalten. Dazu gehört der „Überzug“ der Liposomen mit inerten, biokompatiblen Polymeren wie PEG, der den Liposomen Stabilität verleiht und vor „antigener“ Erkennung schützt (42,43). Eine weitere Optimierung ist die Lipidzusammensetzung der Liposomen.

Zu den Optimierungsmöglichkeiten gehört auch das so genannte „Targeting“. Das heisst: die Liposomen müssen derart modifiziert werden, dass sie ihre Zielzellen spezifisch und effektiv erkennen können. In unserem Falle könnte man die Cytochrom c-Liposomen an ihrer Oberfläche mit monoklonalen Antikörper (z.B. den einen Antikörper gegen den Rezeptor für HER-2 bei Her-2 überexprimierenden Brustkarzinomen) konjugieren, um dadurch eine erhöhte Tumorspezifität erzielen zu können (47,48).

6. Literaturverzeichnis

1. Horvitz H.R., Shaham S. and Hengartner M.O. (1994): The genetics of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Quant. Biol.* 59: 377-385.
2. Jacobson M.D., Weil M. and Raff M.C. (1997): Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354.
3. Ellis H.M. and H.R. Horvitz (1986): Genetic control of programmed cell death in the nematode *C.elegans*. *Cell* 44: 817-829.
4. Hengartner M.O. (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
5. Thompson C.B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462.
6. Van Cruchten S. and van den Broeck W. (2002): Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* 31: 214-223.
7. Kerr J.F., Wyllie A.H. and Currie A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
8. Rebbaa A., Zheng X., Chu F. and Mirkin B.L. (2006): The role of histone acetylation versus DNA damage in drug-induced senescence and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 13: 1960-1967.
9. Majno G. and Joris I. (1995): Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Path.* 146: 3-15.
10. Riedl S.J. and Salvesen G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews* 8: 405-413.
11. Garrido C., Galluzzi L., Brunet M., Puig P.E., Didelot C. and Kroemer G. (2006): *Cell Death and Differentiation* 13: 1423-33.

12. Schafer Z.T. and Kornbluth S. (2006): The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev. Cell* 10: 549-61.
13. Desagher S. and Martinou J.C. (2000): Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10: 369-377.
14. Shimizu S., Narita M. and Tsujimoto Y. (1999): Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-487.
15. Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Susin S.A., Beutner G., Brdiczka D., Rémy R., Xie Z.H., Reed J.C. and Kroemer G. (1998): The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 187: 1261-1271.
16. Zamzami N. and Kroemer G. (2001): The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 67-71.
17. Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A. and Wang X. (1997): Apaf-1, a human protein homologous to C.elegans CED-4, participants in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413.
18. Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.S., Green D.R. and Martin S.J. (1999): Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 144: 281-292.
19. Van de Craen M., Declercq W., van den brande I., Fiers W. and Vandenabeele P. (1999): The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Diff.* 6: 1117-1124.
20. Saikumar P., Dong Z., Mikhailov V., Denton M., Weinberg J.M. and Ventachalam M.A. (1999): Apoptosis: definition, mechanisms and relevance to disease. *Am. J. Med.* 107: 489-506.

21. Peter M.E. and Krammer P.H. (2003): The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10: 26-35.
22. Boldin M.P., Varfolomeev E.E., Pancer Z., Mett I.L., Camonis J.H. and Wallach D. (1995): A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270: 7795-7798.
23. Hsu H., Xiong J. and Goeddel D.V. (1995): The TNF receptor 1- associated protein TRADD signals cell death and NF-B activation. *Cell* 81: 495-504.
24. Enari M., Hug H. and Nagata S. (1995): Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 375: 78-81.
25. Jackson C.E., Fischer R.E., Hsu A.P., Anderson S.M., Choi Y.N., Wang J., Dale J.K., Fleisher T.A., Middleton L.A., Sneller M.C., Lenardo M.J., Straus S.E. and Puck J.M. (1999): Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 1002-14.
26. Jackson C.E. and Puck J.M. (1999): Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr. Opin. Pediatr.* 11: 521-27.
27. Adachi M., Watanabe-Fukunaga R. and Nagata S. (1993): Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of *lpr* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1756-60.
28. Takahashi T., Tanaka M., Brannan C.I., Jenkins N.A., Copeland N.G. (1994): Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76: 969-76.
29. Lynch D.H., Watson M.L., Alderson M.R., Baum P.R. and Miller R.E. (1994): *Immunity* 1: 131-36.
30. Ow Y.L., Green D.R., Hoo Z. and Mak T.W. (2008): Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 532.

31. Li F., Srinivasan A., Wang Y., Armstrong R.C., Tomaselli K.J. and Fritz L.C. (1997): Cell-specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 262: 30299-30305.
32. Zhivotovsky B., Orrenius S., Brustugun O.T. and Døskeland S.O. (1998): Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* 391: 449-450.
33. Neame S.J., Rubin L.L. and Philpott K.L. (1998): Blocking cytochrome c activity within intact neurons inhibits apoptosis. *J. Cell. Biol.* 142: 1583-1593.
34. Bhuyan A.K., Varshney A. and Mathew M.K. (2001): Resting membrane potential as a marker of apoptosis: studies on *Xenopus* oocytes microinjected with cytochrome c. *Cell Death and Differentiation* 8: 63-69.
35. Gabriel B., Sureau F., Casselyn M., Teissié J. and Petit P.X. (2003): Retroactive pathway involving mitochondria in electroloaded cytochrome c-induced apoptosis. Protective properties of Bcl-2 and Bcl-XL. *Exp. Cell Res.* 289: 195-210.
36. Kam N.W.S. and Dai H. (2005): Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 6021-6026.
37. Frauke Pistel K., Breitenbach A., Zange-Volland R. and Kissel T. (2001): Brush-like branched biodegradable polyesters, part III. Protein release from microspheres of poly(vinyl alcohol)-graft-poly(D,L-lactic-co-glycolic acid). *J. Control Release* 73: 7-20.
38. Symon Z., Peyser A., Tzemach D., Lyass O., Sucher E., Shezen E. and Gabizon A. (1999): Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes. *Cancer* 86: 72-78.
39. Perez A.T., Domenech G.H., Frankel C. and Vogel C.L. (2002): Pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) for metastatic breast cancer: the Cancer Research Network. Inc. experience. *Cancer Invest.* 20: 22-29.

40. O'Shaughnessy J.A. (2003): Pegylated liposomal doxorubicin in treatment of breast cancer. *Clin. Breast Cancer* 4: 318-328.
41. Torchilin V.P. (2005): Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews in Drug Discovery* 4: 145-160.
42. Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P. and Huang L. (1990): Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* 268: 235-238.
43. Blume G. and Cevc G. (1993): Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1146: 157-168.
44. Hamburger A.W. and Salmon S.E. (1977): Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J. Clin. Invest.* 60: 846-854.
45. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1982): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
46. Imesch P., Schwendener R., Niedermann P., Scheiner D., Fink D. and Fedier A. (2007): Cytochrome c delivery by pH-sensitive Liposomes induces the intrinsic apoptotic pathway in HeLa cells. *Proceedings AACR* 48: 1118.
47. Sapra P. and Allen T.M. (2002): Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs. *Cancer Res.* 62: 7190-7194.
48. Drummond D.C., Hong K., Park J.W., Benz C.C. and Kirpotin D.B. (2000): Liposome targeting to tumors using vitamin and growth factor receptors. *Vitam. Horm.* 60: 285-332.

7. Verdankungen

Herzlich danken möchte ich allen, die mich bei meiner Dissertation unterstützt, beraten und mir die Dissertation ermöglicht haben:

- Dr. med. Patrick Imesch für die Einführung und Unterstützung (Literatursuche, Besprechungen, Korrektur, Hilfe bei der Diskussion und Interpretation).
- PD Dr. André Fedier für die Einführung und Unterstützung (Laborarbeit, Hilfe bei der Resultatinterpretation, Darstellung der Resultate, Besprechungen, Korrektur).
- Prof. Reto Schwendener (Institut für Molekulare Krebsforschung, Universität Zürich) für die Herstellung der Liposomen und Beratung.
- Prof. Dr. med. Daniel Fink für die Ermöglichung meiner Dissertation.
- Ursula Schuchter für ihre Hilfe und Unterstützung im Labor.
- Meiner Familie für die Ermöglichung meiner Ausbildung.

8. Curriculum vitae

Patrizia Antonia Niedermann von Niederbüren SG

24.4.1983 Geboren in Flawil SG, Bürgerort Niederbüren SG

Ausbildung:

1988-1990 Kindergarten in Niederglatt SG
1990-1996 Primarschule in Niederglatt SG
1996-1998 Sekundarschule in Oberuzwil SG
1998-2002 Kantonsschule am Burggraben, St. Gallen (Matura mit Schwerpunktfach Mathematik-Naturwissenschaften: Biologie und Chemie, Ergänzungsfach Physik)
2002-2005 Humanmedizinstudium in Fribourg
2005-2009 Humanmedizinstudium in Zürich
2009 Staatsexamen

Publikation:

Imesch P, Schwendener R, Niedermann P, Scheiner D, Fink D and Fedier A. Cytochrome c delivery by pH-sensitive Liposomes induces the intrinsic apoptotic pathway in HeLa cells. Proceedings of the American Association for Cancer Research, 48, 2007, S. 1118.